

Université de Montréal

Rôle du CD47 dans le développement et la fonction
des lymphocytes T régulateurs naturels

Par

Jinane Darwiche

Département de microbiologie et immunologie
Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de maîtrise ès sciences
en immunologie et microbiologie

Novembre, 2006

©, Jinane Darwiche, 2006



W
4
US8
2007
V.087

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :
Rôle du CD47 dans le développement et la fonction
des lymphocytes T régulateurs naturels

Présenté par :
Jinane Darwiche

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Walid Mourad, Professeur titulaire, Université de Montréal
Président rapporteur

Dr. Marika Sarfati, Professeure titulaire, Université de Montréal
Directeur de recherche

Dr. Rejean Lapointe, Professeur adjoint, Université de Montréal
Membre du jury

Résumé

Les lymphocytes T régulateurs CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ jouent un rôle important dans le maintien de la tolérance du soi et le contrôle de l'homéostasie immunitaire en s'impliquant activement dans la suppression des réponses immunitaires pathologiques et physiologiques. Plusieurs voies de signalisation, incluant l'IL2, le CD28 et le TGF-β, sont impliquées dans la génération, le développement, et la fonction des lymphocytes T régulateurs naturels (Treg). Nous avons montré récemment que le CD47, une protéine membranaire exprimée de façon ubiquitaire, est impliquée dans la génération de cellules T anergiques et suppressives *in vitro* chez l'homme. Toutefois le rôle du CD47 dans le développement et la fonction des Treg naturels n'était pas clarifié. Dans la présente étude, nous démontrons que l'absence du CD47, entraîne une baisse du nombre absolu des Treg dans le thymus et en périphérie chez des souris âgées entre 8-10 semaines. Quand à la fréquence des CD25⁺ parmi les CD4⁺, elle augmente graduellement et significativement dans la rate et les ganglions périphériques en fonction de l'âge de ces souris. Plus précisément, la proportion des Treg activées CD25⁺ CD44^{high} CD62L^{low} Foxp3⁺ parmi les cellules T CD4⁺ est augmentée chez les souris CD47 déficientes âgées entre 18-36 semaines comparativement aux souris contrôles de type sauvage. La proportion de Treg naïves CD4⁺ CD25⁺ CD44^{low} CD62L^{high} Foxp3⁺, reste stable. L'analyse fonctionnelle des Treg CD47^{-/-} suggère que même si ces cellules maintiennent une capacité suppressive *in vitro* au cours du vieillissement des souris, leur activité régulatrice est fortement

diminuée *in vivo* et ce parallèlement à un seuil d'activation et une production de cytokines augmentés des cellules T effectrices $CD4^{+}CD25^{-}$ $CD47^{-/-}$. Nous concluons que le CD47 contrôle négativement la taille du réservoir de Treg et leur activation, tout en préservant leur fonction suppressive *in vivo*.

Mots clés: CD47, lymphocytes T régulateurs naturels, immunorégulation, hyperactivation lymphocytaire.

Abstract

Regulatory T cells CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ (Tregs) are proven to play an important role in the maintenance of immunological self-tolerance and immune homeostasis by actively suppressing pathological and physiological immune responses. Multiple signaling pathways, that include IL2, CD28 and TGF- β , govern the generation, development, and function of Treg. We recently reported, a role of CD47, a ubiquitously expressed membrane protein, in the generation of human peripheral anergic and suppressive T cells *in vitro*. However, the role of CD47 on the generation and function of naturally occurring Treg wasn't clarified. We herein provide evidence that absence of CD47, led to a decrease in the absolute number of CD4⁺ CD25⁺ Treg in the thymus and periphery in 8-10 week-old mice. Meanwhile, the frequency of CD25⁺ T among CD4⁺ T cells gradually and significantly augmented with age in the spleen and lymph nodes. More precisely, the proportion and absolute number of activated CD25⁺ CD44^{high} CD62L^{low} Foxp3⁺ Treg were significantly increased among CD4⁺ T cells in 18 to 36 week-old CD47-deficient mice when compared to control littermates. In contrast, the proportion of quiescent CD4⁺ CD25⁺ CD44^{low} CD62L^{high} Foxp3⁺ Treg remained stable. Functional analysis revealed that although CD47-deficient Treg exhibited a suppressive activity *in vitro* in old mice, their regulatory function was decreased *in vivo* and this in spite of an enhanced activation threshold and cytokine production in CD47-deficient CD4⁺ CD25⁻ effectors T cells. We

conclude that CD47 negatively regulates the size of peripheral Treg compartment and their activation, while maintaining their function *in vivo*.

Keywords: CD47, regulatory T cells, immune regulation, Lymphocyte hyperactivation.

Remerciements

Je ne saurais remercier assez mon Directeur de recherche, Dr. Marika Sarfati, pour son encadrement stimulant, positif et toujours instructif. Je tiens à lui exprimer ma profonde gratitude et reconnaissance pour la confiance qu'elle m'a accordée durant les deux années d'étude. Je remercie également les Docteurs Marika Sarfati et Guy Delespesse pour leur support permanent et pour la masse de connaissances scientifiques et de valeurs professionnelles qu'ils m'ont transmises.

Je tiens aussi à remercier tous les membres de l'équipe du laboratoire pour l'aide et l'amitié.

Finalement je remercie mon conjoint, Adam Fadlallah, sans le soutien et la compréhension de qui l'achèvement de ce mémoire aurait été impossible.

Table des matières

Résumé.....	3
Abstract.....	5
Remerciements.....	7
Table des matières.....	8
Liste des tableaux.....	11
Liste des figures.....	12
Liste des abréviations.....	14
Section I	17
Introduction.....	17
I.1. Rôle des lymphocytes T régulateurs naturels dans le système immunitaire	17
I.2. Phénotype des lymphocytes T régulateurs naturels.....	22
I.3. Mise en évidence des lymphocytes T régulateurs naturels.....	23
I.3.a. Ablation thymique au jour 3 ou déplétion	23
I.3.b. Transfert adoptif	23
I.3.c. Les anomalies associées aux syndromes auto-immuns	24
I.4. Caractérisations fonctionnelles des lymphocytes T régulateurs naturels	26
I.4.a. État d'anergie et fonction suppressive <i>in vitro</i>	26
I.4.b. Activation continue et rôle protecteur et curatif <i>in vivo</i>	27
I.5. Origine, développement et maintien des lymphocytes T régulateurs naturels .	29
I.5.a. Le thymus.....	29
I.5.b. L'Interleukine-2 et sa signalisation.....	30
I.5.c. La co-stimulation CD28/ B7-1, B7-2	30
I.5.d. Le contrôle génique par Foxp3	31
I.6. Génération extrathymique de Tregs.....	32
I.7. Mécanismes d'action des lymphocytes T régulateurs naturels.....	33
I.8. Les molécules de co-inhibition dans la régulation des réactions immunitaires	36
I.9. La molécule CD47	38

I.9.a. Définition, expression et ligands.....	38
I.9.b. Rôle du CD47 dans la régulation de la réponse immune.....	39
I.10. Objectifs du travail.....	42
Section II.....	43
Matériels et méthodes.....	43
II.1. Model animal.....	43
II.2. Préparation des suspensions cellulaires.....	43
II.3. Marquages cellulaires <i>ex vivo</i>	44
II.4. Cytométrie de flux et analyse par Cellquest.....	45
II.5. Marquages intra-cytoplasmiques.....	45
II.6. Purifications cellulaires	46
II.7. Préparation des APCs.....	47
II.8. Essai de suppression <i>in vitro</i>	48
II.9. Mesure de la prolifération cellulaire.....	48
II.10. Stimulation cellulaire.....	49
II.11. Dosage des cytokines par ELISA	49
II.12. Déplétion ou inactivation des T régulateurs <i>in vivo</i>	50
II.13. Immunisation.....	51
II.14. Restimulation <i>in vitro</i>	51
II.14.a. Marquage au CFSE.....	51
II.14.b. Restimulation avec OVA.....	52
II.14.c. Marquage intracytoplasmique pour Cytokines.....	52
II.15. Statistiques.....	52
Section III.....	53
Résultats.....	53
III.1. Analyse du rôle du CD47 sur la fréquence des CD4 ⁺ CD25 ⁺ dans le thymus et la rate de jeunes souris	53
III.2. Suivi des proportions des CD4 ⁺ et des CD25 ⁺ en fonction de l'âge.....	57
III.3. Analyse des sous-populations de CD4 ⁺ CD25 ⁺ en absence du CD47 en fonction de l'âge.....	60

III.4. Étude de l'expression de Foxp3 dans les CD4 ⁺ CD25 ⁺ de souris CD47 ^{-/-}	70
III.5. Évaluation <i>in vitro</i> de la fonction suppressive des Treg de souris CD47 ^{-/-} ...	72
III.6. Évaluation <i>in vitro</i> du rôle de CD47 sur la fonction des cellules effectrices CD4 ⁺ CD25 ⁻	76
III.7. Évaluation <i>in vivo</i> du rôle de CD47 sur la fonction des Treg et des Lc T CD4 ⁺ effecteurs	78
Section IV	82
Discussion des résultats	82
IV.1. Rôle du CD47 dans le développement des Treg	83
IV.2. Rôle du CD47 dans la fonction suppressive des Treg <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i>	88
IV.3. Rôle du CD47 dans la fonction des cellules effectrices CD4 ⁺ CD25 ⁻	92
Section V	93
Conclusions et perspectives	93
Liste des Références	96

Liste des tableaux

Tableau I. Les manipulations stratégiques des Treg	18
Tableau II. Les anomalies de Treg et l'autoimmunité	25
Tableau III. Phénotype des Lc CD4 ⁺ de la rate des souris CD47 ^{-/-}	67
Tableau IV. Phénotype des Lc CD4 ⁺ des ganglions périphériques des souris CD47 ^{-/-}	68

Liste des figures


Figure 1. Les différentes populations de CD4 jouant un rôle suppresseur.	21
Figure 2. Les mécanismes possibles d'action des Treg <i>in vivo</i>	35
Figure 3. Les pourcentages de Lc CD25 ⁺ parmi les CD4 ⁺ de jeunes souris CD47 ^{-/-} dans le thymus et la rate (8-10 semaines).	54
Figure 4. Les proportions des CD4 ⁺ et D42 ⁺ CD25 ⁺ dans le thymus de jeunes souris CD47 ^{-/-}	55
Figure 5. Les proportions des CD4 ⁺ et CD4 ⁺ CD25 ⁺ dans la rate de jeunes souris CD47 ^{-/-}	56
Figure 6. Les pourcentages de CD4 et de CD25 dans la rate et les ganglions périphériques des souris CD47 ^{-/-} en fonction de l'âge.	59
Figure 7. Distribution des sous-populations de Lc CD25 ⁺ CD4 ⁺ en fonction de l'expression du CD44 chez les vieilles souris CD47 ^{-/-}	62
Figure 8. Les pourcentages des CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD44 ^{hi} dans le thymus, la rate et les ganglions périphériques des souris CD47 ^{-/-} en fonction de l'âge.....	63
Figure 9. Expression de CCR7, CD103 et CD127 sur les sous-populations de Lc CD4 ⁺ chez les souris CD47 ^{-/-}	69
Figure 10. L'expression de Foxp3 dans les cellules CD4 ⁺ CD25 ⁺ chez les vieilles souris CD47 ^{-/-}	71
Figure 11. La fonction suppressive <i>in vitro</i> des Treg de souris CD47 ^{-/-}	74
Figure 12. Titration <i>in vitro</i> de la suppression des Treg de jeunes souris CD47 ^{-/-}	75
Figure 13. La sécrétion de cytokines <i>in vitro</i> par les Lc CD4 ⁺ ainsi que les CD4 ⁺ CD25 ⁻ effecteurs chez les CD47 ^{-/-}	77
Figure 14. La prolifération des CD4 en réponse secondaire après déplétion des Treg CD47 ^{-/-} <i>in vivo</i>	80
Figure 15. La synthèse d'IFN γ en réponse secondaire après déplétion des Treg CD47 ^{-/-} <i>in vivo</i>	81

Figure 16. Les mécanismes possibles expliquant l'augmentation du pourcentage des $CD4^+CD25^+CD44^{high}Foxp3^+$ chez les souris $CD47^{-/-}$ 87

Liste des abréviations

α -CD3	Anti-CD3
Ag	Antigène
APC	Antigen Presenting Cell (Cellule présentatrice d'Antigène)
BTLA	B and T lymphocyte attenuator
CD4 SP	Lymphocytes CD4 Simple Positif
CFSE	Carboxy-fluorescein diacetate, succinimidyl ester
CMH-I	Complexe Majeur d'Histocompatibilité classe I
CMH-II	Complexe Majeur d'Histocompatibilité classe II
CTLA-4	Cytotoxic T-lymphocyte antigen-4
CPM	Counts per minute (utilisée comme mesure de radioactivité)
DC	Dendritic Cell (Cellule Dendritique)
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
FCS	Fœtal Calf serum
Ggls	Ganglions lymphatiques
GITR	Glucocorticoid-Induced Tumour necrosis factor Receptor
GR	Globules Rouges
[³ H]	Thymidine radioactive
IAP	Integrin Associated Protein (CD47)
IBD	Inflammatory Bowel Disease
IC	Intra-Cytoplasmique
ITIM	Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motifs

KIR	killer Ig-like Receptor
KO	Knock-Out (Souris déficientes)
Lc	Lymphocyte
LPS	Lipopolysaccharide
μci	Microcurie
MFI	Mean of Fluorescence Intensity
MBP	Myelin basic protein
MBq	Mega Becquerel (1 Curie = 3.7×10^{10} Becquerel)
mBSA	Methylated bovine serum albumin
μg/ml	Microgramme par millilitre
NKT	Natural killer T cells (lymphocyte T NK)
n.s.	Non significatif
OVA	Ovalbumine
PBL	Peripheral Blood Lymphocytes
PD1	protectin D1
Pg/ml	Picogramme par millilitre
SD	Déviatiion Standard
SEM	Standard Error of the Mean (SEM= SD/\sqrt{n})
SIRP	Signal-Regulatory protein
TAS	T anergic and suppressive
TCR	Récepteur des lymphocytes T
Teff	Lymphocyte T effecteur
Treg	Lymphocyte T régulateur



TSP	Thrombospondin
WT	Wild Type (Souris de Type sauvage)

Section I

Introduction

I.1. Rôle des lymphocytes T régulateurs naturels dans le système immunitaire

Le système immunitaire est muni de plusieurs mécanismes cellulaires et moléculaires régulateurs mis en place pour éviter les dommages collatéraux lors d'une réponse défensive, supprimer toute réponse immunitaire inappropriée et surtout maintenir la tolérance immunologique aux antigènes du soi. La sélection centrale et l'élimination de lymphocytes T autoréactifs dans le thymus contribuent fortement à l'induction de la tolérance immunitaire. Cependant il s'agit d'un mécanisme incomplet puisque des lymphocytes T pathogéniques autoréactifs échappent à la sélection et se retrouvent en périphérie chez les sujets normaux. Ceci implique la mise en place de moyens supplémentaires d'induction de tolérance afin d'assurer la protection de l'hôte contre le développement inopiné de maladies auto-immunitaires.

Les lymphocytes T régulateurs représentent un des principaux mécanismes de tolérance périphérique aux antigènes du soi et semblent potentiellement importants pour intervenir dans différents aspects de la réponse immunitaire tels que: le contrôle des maladies auto-immunes, l'homéostasie gastro-intestinale, les allergies, le cancer, les infections persistantes, la tolérance fœtale et la tolérance des greffes (Fehérvári, 2004b; Baecher-Allan, 2004). Les stratégies cliniques proposées pour l'utilisation des Treg en thérapie sont résumées dans le tableau I.

Applications cliniques potentielles des CD4⁺CD25⁺ Treg	Condition cible	Approche thérapeutique potentielle
Promotion de la fonction des Treg	Transplantation, maladies auto- immunes, allergie	Transfert de Treg, promotion de la fonction suppressive spécifique, transduction ex-vivo du gène Foxp3; génération ex- vivo de Treg par des cytokines, des agents pharmacologiques ou des cellules dendritiques modifiées
Réduction ou inhibition de la fonction des Treg	Cancer, maladies infectieuses	Déplétion des Treg ou inhibition de leur fonction pour promouvoir les réponses immunes; anti-CTLA-4,- CD25, -GITR (mAbs)

Tableau I. Les manipulations stratégiques des Treg

Les manipulations stratégiques des Treg pouvant avoir des résultats cliniques bénéfiques (Fehérvári, 2004b).

Tiré et modifié à partir de Journal of clinical investigation 114 (9):1209-1217, 2004.

Plusieurs types de lymphocytes T régulateurs ont été décrits jusqu'à présent: Les lymphocytes T régulateurs naturels $CD4^+CD25^+$ ou Treg, les lymphocytes T régulateurs adaptifs incluant les cellules T_R1 et les cellules T_{H3} , les lymphocytes T $CD8^+$ régulateurs récemment décrits et une sous-population des cellules NKT connues par ($\alpha 14i$) NKT ou iNKT (figure1).

Les cellules Treg: les lymphocytes T régulateurs naturels apparaissent durant le développement thymique pour se retrouver par la suite en périphérie. Cette sous-population représente 5 -15 % des lymphocytes T $CD4^+$ chez l'homme adulte sain et chez la souris non manipulée. Elle est caractérisée par l'expression constitutive du CD25. Ces cellules semblent intervenir dans la suppression fonctionnelle d'une variété de cellules du système immunitaire inné ainsi qu'adaptif (lymphocytes $CD4^+$, $CD8^+$, Lymphocytes B et cellules dendritiques). Les connaissances sur cette population cellulaire sont en pleine expansion (Sakaguchi, 2004).

Les cellules T_{R1} : elles sont aussi dites « IL-10 Treg » puisque cette cytokine, l'IL-10, est impliquée à la fois dans leur génération et leur fonction. Les T_{R1} sont induites à partir de T $CD4^+$ naïves au repos. Elles peuvent être différenciées *ex vivo* par l'activation répétitive via le récepteur à l'antigène (Li, 2001) en présence de grandes concentrations d'IL-10, de la vitamine D3 et du dexaméthasone (Barrat, 2002) ou *in vivo* (en périphérie) par l'administration orale (voie muqueuse) de peptides solubles ou de superantigènes. Une fois maturées, ces cellules secrètent l'IL-10 en grande quantité (Battaglia, 2006).

Les cellules T_{H3} : comme les T_{R1} , les T_{H3} sont induites à partir des mêmes précurseurs mais diffèrent de ceux-ci de par leur profil de cytokines, qui est dans ce cas le TGF- β , et les antigènes d'induction qui sont des protéines complètes (Chen, 1994). Les T_{R1} et les T_{H3} surtout abondantes dans la muqueuse intestinale, sont responsables du maintien de la tolérance orale en inhibant la réponse immunitaire contre les nombreux antigènes alimentaires (Lan, 2005).

Les cellules Treg CD8^{low} : elles sont induites chez la souris par des injections répétitives de molécules de CMH-I chargées d'antigènes; elles sont capables d'inhiber la réponse immune contre l'antigène en question. Le TGF- β est impliqué dans la fonction de ces cellules, cependant ce n'est pas le seul candidat puisque des régimes de neutralisation de ce dernier ne préviennent pas la régulation ce qui laisse la porte ouverte à d'autres mécanismes possibles, tel que suggéré par leur profil Tc2 (IL-4, IL-5) et non pas Tc1 (TNF- α , IFN- γ et IL-2) (Maile, 2006).

Les lymphocytes NKT régulateurs : ce sont soit des cellules CD4⁺ soit des cellules doubles négatives (CD4⁻CD8⁻) qui reconnaissent des glycolipides présentés par une molécule du CMH classe I non classique, la CD1d. La plupart de ces cellules expriment un réarrangement $\nu\alpha 14 / j\alpha 18$ du TCR avec une région CDR3 invariante. L'activation naturelle de ces cellules ou l'activation par un ligand provenant d'une éponge marine (le alpha GalCer) peut prévenir l'auto-immunité et l'inflammation (Kronenberg, 2006).

D'autres populations de cellules régulatrices, moins bien caractérisées ont été aussi rapportés tel que : des CD4⁺CD25⁻, des CD8⁺CD25⁻ et des CD8⁺CD28⁺.

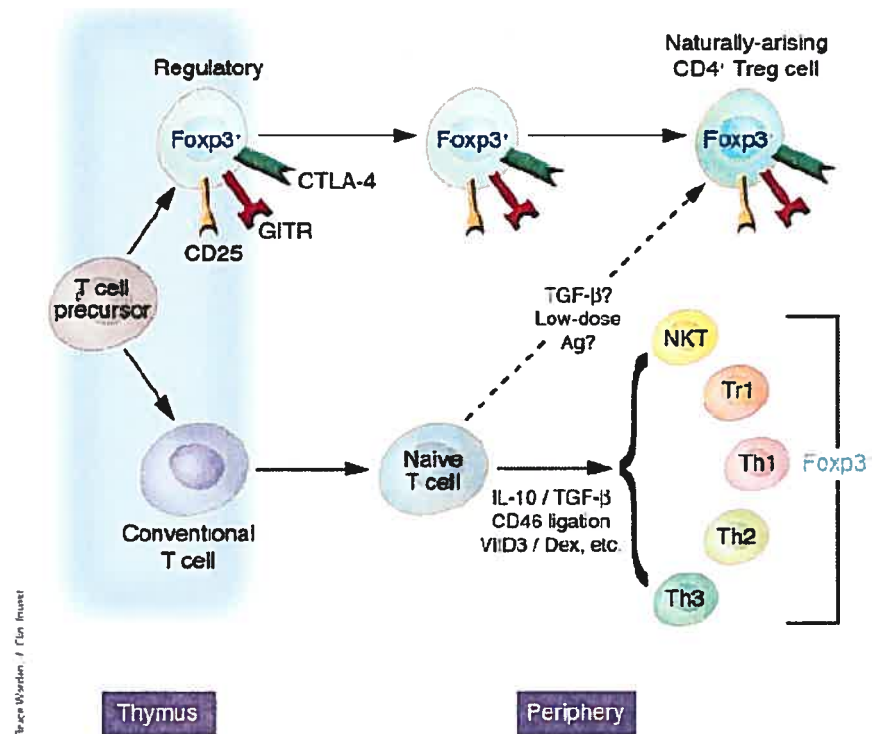


Figure 1. Les différentes populations de CD4 jouant un rôle suppresseur.

Les différentes populations de CD4⁺ pouvant jouer un rôle suppresseur sont soit naturelles, originaires du thymus ou induites en périphérie à partir des cellules conventionnelles dans certaines conditions favorisantes (Fehérvári, 2004b). Illustration, par Bruce Worden, tirée à partir de Journal of clinical investigation 114 (9):1209-1217, 2004.

1.2. Phénotype des lymphocytes T régulateurs naturels

La caractérisation phénotypique des Treg fut difficile et n'est pas encore définitive puisque ces dernières expriment une variété de molécules plus souvent associées à l'état d'activation des lymphocytes ou bien exprimées sur les lymphocytes mémoires. Le marqueur de surface par excellence est le CD25 (la chaîne alpha du récepteur à l'IL-2). Contrairement aux cellules effectrices conventionnelles qui expriment ce marqueur suite à leur activation et pour une durée limitée, les Treg l'expriment de manière constitutive, et à un niveau élevé. Ces cellules expriment aussi à des niveaux très élevés le CTLA-4, GITR (glucocorticoïde-induced tumor necrosis factor receptor), OX-40L, CD5 et CD103 (Li, 2002). Elles sont CD45RB^{lo} chez la souris et CD45RO^{hi} chez l'homme; elles expriment aussi Ly6 et PD1 (programmed cell death1). Tous ces marqueurs, mis à part le CD103, ne sont pas exclusifs aux Treg (Lan, 2005). Deux nouveaux marqueurs semblent être relativement prometteurs pour l'identification des Treg: la neuropilin-1 et le gène d'activation des lymphocytes LAG-3. La neuropilin-1 est un récepteur impliqué dans la *guidance* des exons, l'angiogenèse et l'activation des lymphocytes T (Thompson, 2004); LAG-3 est à son tour exprimé chez la souris à la surface des Treg naturels ainsi que des Treg adaptatifs ou induits à l'extérieur du thymus (Lan, 2005; Huang, 2004). Dernièrement, l'expression diminuée du CD127 (IL-7R^{lo}) fut associée à l'identification des Treg (Liu, 2006; Seddiki, 2006).

Jusqu'à présent, le marqueur le plus précis des Treg parmi tous les marqueurs décrits est le facteur de transcription Foxp3 (forkhead/winged-helix family transcriptional repressor p3) chez l'homme ainsi que chez la souris. En plus d'être un marqueur important, des études récentes ont démontré que Foxp3 joue un rôle déterminant dans le développement et la fonction des Treg (Fehérvári, 2004b; Ziegler, 2006). Finalement, une expression différentielle inversée du CD44 et du CD62L (L selectin) partage les Treg en deux sous-populations: les lymphocytes T Régulateurs non activées « quiescent Treg » aussi dites Treg naïves ou au repos (CD4⁺CD25⁺CD62L^{hi}CD44^{lo}) et celles de phénotype activé dites « activated-effector-

memory-like Treg » ($CD4^+CD25^+CD62L^loCD44^{hi}$) (Fisson, 2003). Les Treg naïves expriment des niveaux élevés de CD62L et CCR7 ce qui leur permet de recirculer via les ganglions lymphatiques, alors que les Treg activées expriment différents récepteurs de chimiokines, de molécules d'adhésion et des ligands de selectine et migrent efficacement dans les tissus inflammatoires (Siegmund, 2005).

I.3. Mise en évidence des lymphocytes T régulateurs naturels

L'existence d'une population de lymphocytes T dotée d'activité suppressive et qui protège contre le développement de syndromes auto-immuns a été suggérée depuis très longtemps suite à des évidences expérimentales obtenues chez différents modèles animaux :

I.3.a. Ablation thymique au jour 3 ou déplétion

Dès 1969 Nishizuka et Sakakura ont montré que l'ablation néonatale du thymus chez des souris normales entre les jours 2 et 4 après la naissance entraîne une destruction des ovaires, qui paraît de nature auto-immune. En 1973, Penhale et al. ont rapporté que l'ablation thymique chez des rats adultes, suivie par plusieurs expositions à des irradiations X sous-léthales, entraîne le développement de thyroïdite auto-immune (Nishizuka, 1969; Penhale, 1973; Sakaguchi, 2004).

I.3.b. Transfert adoptif

Suite aux observations précédentes, plusieurs équipes ont postulé l'existence d'une population cellulaire provenant du thymus capable d'inhiber les réactions auto-immunitaires en périphérie. En 1985, Sakaguchi et al. démontraient que le transfert de cellules de rate, isolées d'une souris normale et dépourvues en $CD4^+CD5^{high}$, dans une souris congénique déficiente en lymphocytes T (souris athymique, nue) provoque le développement spontané de syndrome auto-immun dans plusieurs organes

du receveur (Estomac, Thyroïde, Ovaires) (Sakaguchi, 1985). Par la suite Powrie et al. et Morrissey et al., ont démontré que le transfert de cellules $CD4^+CD45RB^{hi}$ chez une souris SCID (T et B déficiente) induit la maladie inflammatoire intestinale ou IBD (Morrissey, 1993; Powrie, 1993). Finalement, Sakaguchi et collaborateurs ont restreint la définition aux cellules $CD4^+CD25^+$ démontrant ainsi que le transfert de cellules dépourvues de ces dernières chez une souris athymique nue provoque une incidence accrue des maladies auto-immunes, touchant un plus large spectre d'organes, comparativement aux transferts pratiqués dans les études précédentes (Sakaguchi, 1995).

I.3.c. Les anomalies associées aux syndromes auto-immuns

Chez la souris, différents syndromes d'auto-immunité sont reliés à la déplétion ou à l'altération fonctionnelle des Treg (tableau II). La mutation Scurfy chez la souris et le syndrome IPEX chez l'homme sont dus à une mutation analogue du gène *Foxp3* chez les deux espèces et aboutissent donc principalement à un défaut des cellules T régulatrices. La pathologie auto-immune qui résulte de cette mutation est considérée, chez l'homme comme chez la souris, comme une maladie auto-immunitaire agressive à évolution rapide (Chang, 2006; Bennett, 2001; Brunkow, 2001). La sarcoïdose est une autre maladie immunitaire associée à une augmentation des Treg; les causes exactes de ce paradoxe immun, qui affecte le plus souvent les poumons, sont demeurées inconnues pendant très longtemps. Des études cliniques récentes ont démontré que cette maladie est accompagnée d'une expansion du nombre de Treg ($CD4^+CD25^{++}Foxp3^+$) dans le sang, les liquides de lavage bronchoalvéolaire et dans les granulomes des patients atteints de la forme active de la maladie. Ces Treg détiennent une forte activité antiproliférative, mais sont incapables d'inhiber complètement la production de cytokines particulièrement celle du $TNF-\alpha$ qui joue un rôle important dans la formation des granulomes (Miyara, 2006; Planck, 2003).

Conditions	Maladies autoimmunitaires
Déficiences géniques	
Foxp3	+
IL-2	+
IL-2Ra	+
IL-2Rb	+
CTLA-4	+
Tnfrsf18	-
Traitement aux anticorps monoclonaux	
anti-IL-2 (N)	+
anti-CD25 (D)	+
anti-CTLA4 (B)	+
anti-GITR (A)	+

Tableau II. Les anomalies de Treg et l'autoimmunité

Des anomalies (génétiques ou induites) de la génération ou de la fonction des Treg pourraient induire le développement des maladies auto-immunitaires (Sakaguchi, 2005).

N = neutralisant

D = dépletant

B = bloquant

A = agoniste

Tiré et modifié à partir de Nature Immunology 6 (4):345-352, 2005.

I.4. Caractérisations fonctionnelles des lymphocytes T régulateurs naturels

I.4.a. État d'anergie et fonction suppressive *in vitro*

Les expériences *in vitro* ont démontré clairement que la prolifération des Treg ne suit pas les règles établies dans le cadre des cellules effectrices, et sont alors décrites comme étant anergiques. En effet, ces cellules sont réfractaires à l'activation conventionnelle. Elles ne prolifèrent pas et ne secrètent pas l'IL-2 suite à une stimulation par le TCR (anti-TCR ou anti-CD3 fixés dans les plaques ou ajoutés sous forme soluble en présence d'APCs de rate) (Takahashi, 1998; Thornton, 1998). La fonction suppressive des Treg *in vitro* est évaluée par des tests standardisés de coculture les mettant en présence de cellules effectrices $CD4^+CD25^-$. Ces cocultures démontrent une inhibition importante de la prolifération polyclonale des cellules effectrices suggérant ainsi une suppression non spécifique de la part des Treg. Des études effectuées avec des cellules de souris transgéniques ont démontré par la suite que les Treg doivent être activées par leur Ag correspondant, et qu'une fois activées elles sont capables d'inhiber l'activation d'effecteurs possédant une spécificité identique ou différente (Thornton, 2000). Une autre caractéristique importante des Treg est leur sensibilité à la signalisation par le TCR *in vitro*. En effet, ces cellules sont déjà induites et exercent une suppression lors d'une exposition à des concentrations de peptides 100 fois inférieures à celles requises pour la prolifération des $CD4^+CD25^-$ (Takahashi, 1998; Walker, 2003). Finalement, l'état d'anergie de ces cellules reconnu *in vitro* a été récemment démantelé *in vitro* et *in vivo*. Les mêmes essais de coculture effectués, cette fois-ci, en présence de cellules dendritiques comme APC (plus particulièrement avec de grandes concentrations de DCs matures) induisaient l'expansion des Treg à des niveaux comparables à ceux des cellules effectrices $CD4^+CD25^-$ (Yamazaki, 2003). Plusieurs autres études ont montré la réversion de l'état d'anergie des Treg *in vitro* soit par

l'addition de certaines cytokines exogènes dans le milieu de culture (l'IL-2, l'IL-4 et l'IL-15) ou encore par une co-stimulation par le biais du CD28 (Takahashi, 1998; Thornton, 1998). Ce qui laisse à croire que des conditions spécifiques, généralement absentes des milieux de culture conventionnels, sont nécessaires pour la prolifération de ces cellules (Fehérvári, 2004b).

I.4.b. Activation continue et rôle protecteur et curatif *in vivo*

Contrairement à leur état anergique *in vitro*, les Treg se montrent très actives *in vivo*. Leur comportement *in vivo* a été suivi par des expériences de transfert adoptif de Treg antigène spécifiques. Ces cellules, retracées grâce à leur spécificité, démontrent une expansion massive après immunisation de l'hôte; elles s'accumulent de préférence dans les ganglions drainant le tissu où l'antigène correspondant s'exprime et prennent le dessus sur les cellules effectrices spécifiques quand celles-ci étaient injectées au même moment (Walker, 2003). Même à l'état de base, *steady state* (sans immunisation), on rapporte pareilles observations. En effet, ces cellules sont spécifiques aux antigènes de soi, auxquels elles sont exposées en tout temps. La sous-population activée des Treg se montre en division extensive, alors que la sous-population naïve demeure au repos, possède une longue durée de vie (de l'ordre de quelques mois) et semble constituer le réservoir des Treg activées en périphérie (Fisson, 2003).

Simultanément à la caractérisation de ces cellules, Sakaguchi et al. ont montré leur rôle préventif en autoimmunité dans des expériences de co-transfert avec des cellules pathogéniques. Depuis, l'intérêt thérapeutique porté aux lymphocytes T régulateurs ne cesse d'augmenter et une multitude de modèles d'auto-immunité dans lesquels le transfert de Treg prévient l'induction de la maladie ont été étudiés. Deux exceptions, dans lesquelles le transfert de Treg parvient à stabiliser une maladie déjà installée plutôt que d'agir seulement à titre préventif ont aussi été reportées (i.e. les cas du diabète et de la colite expérimentale).

Modèle d'encéphalomyélite autoimmune expérimentale EAE : ce modèle expérimental de la sclérose en plaques humaine est induit spontanément chez les souris possédant un répertoire de $CD4^+$ totaux alpha bêta spécifique de la myéline MBP; l'administration de $CD4^+$ thymique ou de rate à partir de souris sauvages syngéniques prévient le développement de cette maladie (Furtado, 2001).

Modèle d'arthrite expérimentale induite : La déplétion des cellules $CD25^+$ chez des animaux immunisés avant l'induction antigénique de l'arthrite (par le mBSA Sérum Albumine de Veau) augmente la réponse immunitaire cellulaire et humorale ainsi que la sévérité du syndrome; le transfert des $CD4^+CD25^+$ au moment de l'induction ne prévient pas le développement mais atténue la maladie (Frey, 2005).

Modèle de la maladie inflammatoire des intestins (Inflammatory Bowel Disease or IBD) : les modèles murins du IBD constituent un outil important pour étudier la régulation de l'inflammation intestinale et ont permis l'exploration des fonctions des Treg. La colite auto-immune peut être induite chez des souris immuno-déficientes par un transfert d'une population de lymphocytes T pathogéniques ($CD45RB^{hi}$) ou par une infection par *Helicobacter hepaticus* ou autres pathogènes intestinales et ceci résulte de l'absence des Treg $CD4^+CD25^+$ chez les souris receveuses. Le modèle de colite est intéressant puisque le transfert des Treg $CD4^+CD25^+$ était capable non seulement de prévenir l'induction, mais aussi de guérir une colite déjà établie. Les études dans ce cadre ont aussi montré que la régulation se passe dans les organes lymphoïdes secondaires ainsi que dans les sites de l'inflammation (Coombes, 2005).

Modèle de diabète type 1 : le transfert de 10^7 Treg BDC2.5 antigène spécifique, pré-amplifiées *in vitro*, chez des souris diabétiques était capable de reverser le diabète après le début de la maladie (Tang, 2004).

À part les maladies auto immunes, le rôle des Treg était aussi étudié dans plusieurs autres pathologies immunitaires comme l'asthme, le cancer, le GVHD et certaines maladies infectieuses.

I.5. Origine, développement et maintien des lymphocytes T régulateurs naturels

I.5.a. Le thymus

Il est bien établi que le thymus est l'organe générateur des Treg. Cette propriété est décrite comme étant la troisième fonction de cet organe à côté des mécanismes de la sélection et de maturation des lymphocytes T (Maggi, 2005; Seddon, 2000). Les Treg ont un répertoire polyclonal aussi diversifié que celui des $CD4^+CD25^-$ autoréactifs. Grâce aux modèles de souris doubles transgéniques, il est maintenant connu que les Treg se développent suite à la reconnaissance de forte affinité des antigènes de soi présentés dans un contexte CMH-II. Chez ces souris transgéniques, la majorité des Treg expriment une chaîne alpha endogène du récepteur TCR avec une chaîne bêta du transgène, contrairement aux $CD4^+CD25^-$ qui expriment un TCR complètement transgénique (Fehérvári, 2004a; Itoh, 1999; Kawahata, 2002). Il restera à déterminer la raison pour laquelle ces thymocytes auto-réactifs échappent à la sélection négative et se différencient en T régulateurs. Certains auteurs ont postulé que l'avidité d'interaction avec les antigènes du soi est particulière, et résulte d'une sélection positive et d'une induction de signaux qui induisent ces cellules à produire des molécules anti-apoptotiques les protégeant ainsi de la sélection négative (Maggi, 2005; Jordan, 2001). D'autres postulent une affinité intermédiaire suffisante pour induire l'anergie et les caractéristiques suppressives mais insuffisante pour induire la délétion clonale (Fontenot, 2004; Itoh, 1999).

I.5.b. L'Interleukine 2 et sa signalisation

L'IL-2 était considérée pendant des années comme « le facteur de croissance » des cellules effectrices de par sa capacité à stimuler leur prolifération et leur expansion *in vitro*. Le fait que les souris IL-2^{-/-} souffrent d'un syndrome lympho-prolifératif auto-immun fatal était surprenant. Les études ont par suite montré qu'une fonction principale de l'IL-2 *in vivo* est de maintenir la tolérance du soi via le contrôle des Treg. La proportion de Treg est réduite chez les souris IL-2^{-/-} indiquant un rôle de l'IL-2 dans le développement de ceux-ci. Ce rôle est également attribué à la signalisation de l'IL-2 puisque la diminution des Treg et les mêmes syndromes d'auto-immunité sont observables chez les souris IL-2 R α ^{-/-} ou IL-2 R β ^{-/-}. Le transfert adoptif de moelle osseuse normale ou de cellules T du type sauvage dans des souris déficientes pour l'IL-2 ou pour les chaînes alpha ou bêta du récepteur à l'IL-2 prévient les activités pathologiques associées à ces déficiences (Fontenot, 2004; Malek, 2003; Sadlack, 1993; Suzuki, 1995).

I.5.c. La co-stimulation CD28/B7-1, B7-2

La signalisation via le CD28 est importante pour la génération thymique et le maintien périphérique des Treg. La génération des Treg est fortement diminuée dans le thymus et la périphérie des souris déficientes en CD28 ou CD80 (B7-1). Ceci explique l'aggravation inattendue du diabète spontané chez les souris NOD CD28^{-/-} (Salomon, 2000). De plus, le traitement de souris par des anticorps bloquants CD80 et CD86 pendant 10 jours, réduit de 50% la proportion de Treg alors que cette réduction est de 25% en cas de thymectomie, ceci supporte un rôle dans le maintien périphérique des Treg (Tang, 2003). Étant donné du rôle de CD28 dans l'induction de l'IL-2 par les cellules activées, il est possible que les effets sur les Treg soient dus à un effet indirect de l'IL-2 (Fontenot, 2004; Tang, 2003).

I.5.d. Le contrôle génique par Foxp3

Le syndrome IPEX chez l'homme ainsi que le modèle correspondant scurfy chez la souris sont caractérisés par une immunodéficiência associée à une auto-immunité endocrine, à l'IBD, à une dermatite atopique et des infections fatales et sont d'origine génétique. Le gène responsable est le Foxp3 (FOXP3 chez l'homme) qui code pour un facteur de répression transcriptionnel « scurfín ». Les études murines ont montré que l'ARNm Foxp3 ainsi que la protéine scurfín sont spécifiquement exprimés de manière prédominante dans le cytoplasme des Treg CD4⁺CD25⁺; les souris mutantes scurfy et ceux avec une délétion génique de Foxp3 ne développaient pas de Treg. Par opposition, le nombre des Treg est augmenté chez les souris Foxp3 transgéniques. La transduction rétrovirale du Foxp3 dans des cellules CD4⁺CD25⁻ non régulatrices de souris confère la fonction régulatrice à ces dernières de telle manière que le cotransfer des ces cellules avec les cellules pathogéniques dans une souris SCID prévient le développement d'auto-immunité (Hori, 2003; Khattri, 2003; Fontenot, 2005). Ces évidences démontrent un rôle primordial de Foxp3 dans la génération ainsi que la fonction des Treg (Fehérvári, 2004a; Fontenot, 2003; Seddon, 2000; Yagi, 2004).

I.6. Génération extrathymique des Treg

Le thymus représentait pour plusieurs années, l'origine unique des Lc T régulateurs naturels $CD4^+CD25^+Foxp3^+$. Des études récentes dans le domaine commencent à élucider la possibilité d'un développement périphérique – en dehors du thymus – de ces mêmes Lc T régulateurs naturels $CD4^+CD25^+Foxp3^+$. La possibilité d'une génération extrathymique de $CD4^+CD25^+$ Treg à partir de cellules $CD4^+$ naïves fut un sujet très controversé. Plusieurs études se sont adressées à cette possibilité :

Le vieux concept de tolérance à faible dose « low-dose tolerance » ou à doses sub-immunogéniques administrées par voie intraveineuse a été re-adressé; ceci est réalisé par l'utilisation de pompes osmotiques fournissant l'antigène peptidique à des souris transgéniques (TCR spécifiques d'un Ag) en quantités contrôlées par minute. Suite à cette technique, les auteurs décrivaient l'apparition de cellules $CD4^+CD25^+$ caractérisées par la fonction suppressive, le phénotype des Treg et l'expression de Foxp3. Le développement extrathymique des Treg était aussi confirmé dans les souris TCR spécifiques de fond génétique $RAG^{-/-}$ qui sont normalement dépourvues de la population $CD4^+CD25^+$ (Apostolou, 2004; Mitchison, 1964).

D'autres études *in vitro* ont reporté que l'addition exogène de TGF- β induit le développement de Treg $CD4^+CD25^+Foxp3^+$, à partir de cellules T $CD4^+CD25^-$ conventionnelles ou RAG déficientes (Chen, 2003a; Gorelik, 2002).

Dernièrement le rôle de l'IL-2 dans le maintien de la tolérance du soi a été disséqué dans un modèle TCR spécifique complexe, démontrant ainsi que cette cytokine est un facteur de croissance qui supporte séquentiellement la survie et la fonction des cellules $CD4^+CD25^-$ naïves assurant leur activation en cellules effectrices $CD4^+CD25^+Foxp3^-$ puis leur conversion en Treg $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ plus tard durant la réponse (Knoechel, 2005).

Toutes les études qui ont démontré la conversion de cellules effectrices en Treg confirment que Foxp3 est exprimé dans le cytoplasme des Treg ainsi induites (Fehérvári, 2004b; Kretschmer, 2005).

I.7. Mécanismes d'action des lymphocytes T régulateurs naturels

Les mécanismes précis de suppression par les Treg ne sont pas encore clairement définis et ceux qui sont décrits *in vitro* diffèrent de ceux démontrés *in vivo* (figure 2).

- Plusieurs observations *in vitro* pointent vers une action dépendante du contact intercellulaire: la séparation des Treg de leurs cellules cibles par une membrane semi-perméable (transwell) inhibait la suppression, l'absence des APCs du milieu de coculture n'affecte pas la suppression, le surnageant de cocultures ou de stimulation de Treg ne transmet pas la suppression. Parmi les candidats possibles de contribuer à la fonction inhibitrice de contact des Treg figurent les molécules suppressives conventionnelles des cellules T : le CTLA-4 et le TGF- β membranaires; des récentes études démontrent un autre rôle de toxicité via la sécrétion de Granzyme B et de perforine exercé de manière FAS-indépendante. Finalement un rôle a été attribué aussi au LAG-3 dans cette même fonction des Treg (Huang, 2004; Lan, 2005).
- Un autre mécanisme démontré *in vitro* concerne l'IL-2. Premièrement par compétition, les Treg exprimant le récepteur de forte affinité à l'IL-2, consomment cette cytokine et privent les cellules effectrices de ce facteur de croissance (De la rosa, 2004). Deuxièmement, par inhibition de la transcription de l'IL-2 par les CD4⁺CD25⁻ (Shevach, 2002).
- *In vivo* un rôle directement apporté par les cytokines a été montré puisque la neutralisation de l'IL-10 et du TGF- β dans le modèle de colite après transfert adoptif de Treg élimine l'effet protecteur de ces cellules. Il en est de même si les Treg utilisées pour le transfert adoptif provenaient de souris IL-10^{-/-} (Powrie, 1996; Asseman, 1999; Fehérvári, 2004a).
- De façon indirecte, les Treg peuvent supprimer les fonctions des cellules effectrices via la modulation des cellules dendritiques. Les Treg sont capables d'affecter la fonction des cellules dendritiques en les rendant moins efficaces dans l'activation des cellules T naïves et ce en diminuant les niveaux d'expression de CD80 et du CD86 de leur surface. Un autre effet via les DC est

assuré par l'activation de l'enzyme Indoleamine-2,3-dioxygénase (IDO) dans la DC suite à l'engagement de son B7 de surface par le CTLA-4 des Treg. IDO catalyse la conversion du tryptophane en kynurenine et autres métabolites exerçant un pouvoir immuno-suppresseur dans l'environnement local des cellules dendritiques et des lymphocytes T (Cederbom, 2000; Fallarino, 2003; Munn, 2004; Fehérvári, 2004a).

- Un nouveau concept basé sur la « tolérance infectieuse » (Jonuleit, 2002) est aussi décrit comme fonction indirecte par laquelle les cellules Treg deviennent contagieuses et transmettent leur suppression aux cellules $CD4^+CD25^-$ avoisinantes (Beissert, 2006; Jonuleit, 2002).
- Des études récentes ont tenté de visualiser les interactions cellulaires entre les Treg et les cellules cibles *in vivo* durant la phase de suppression active par le biais de la microscopie du laser à deux photons. Des contacts directs, stables et de longues durées étaient observés entre les Treg et les cellules dendritiques et jamais avec les cellules effectrices $CD4^+CD25^-$ (Tadokoro, 2006; Tang, 2006a). Ces observations favorisent un mode d'action par lequel les Treg influencent les réponses immunitaires en ciblant la présentation antigénique.

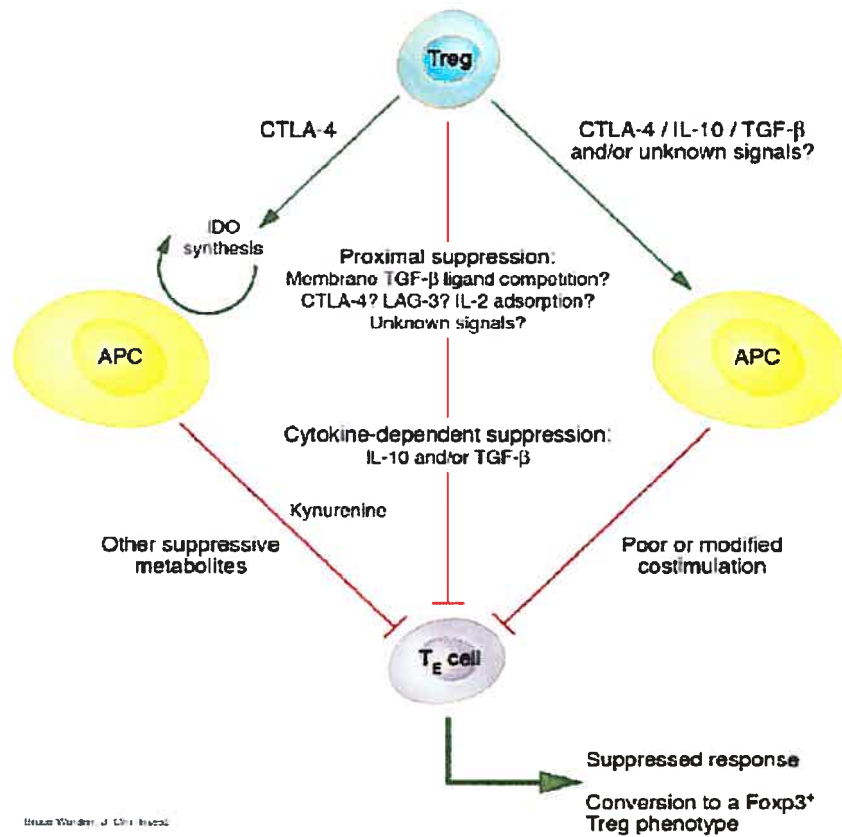


Figure 2. Les mécanismes possibles d'action des Treg *in vivo*.

Différents mécanismes de suppression ont été attribués aux Treg *in vivo* (Fehérvári, 2004b). Illustration, par Bruce Worden, tirée à partir de Journal of Clinical Investigation 114(9):1209-1217, 2004.

I.8. Les molécules de co-inhibition dans la régulation des réactions immunitaires

Une réaction immunitaire nécessite des interactions entre une multitude d'immuno-récepteurs et de costimulateurs avec leurs ligands pour enclencher une cascade de signalisation menant à l'activation des cellules effectrices. Parallèlement à ces molécules de co-stimulation, plusieurs molécules de signalisation négative (*rétrocontrôle négatif*) ont été identifiées et démontrent des rôles déterminants dans l'aboutissement d'une réponse lymphocytaire déjà installée.

Durant la réponse innée, les cellules NK possèdent différents récepteurs d'inhibition : les KIRs (Killer cells Ig like Receptor) chez l'homme, Ly-49 chez la souris ou CD49-NKG2A-B commun aux deux espèces.

Plusieurs autres molécules interviennent pendant la réponse adaptative : le récepteur Fc inhibiteur (FcγRIIB) sur les lymphocytes B, les macrophages, les neutrophiles et les mastocytes (Tang, 2004).

Trois autres types de récepteurs inhibent profondément l'activation immune via leur liaison aux membres de la famille B7 (B7-1 et B7-2): Le CTLA-4 (CTL-associated antigen-4), la molécule d'inhibition la mieux caractérisée, exprimée sur les cellules T après activation, capable de freiner l'activation de ces cellules d'une manière marquée ce qui explique le désordre lympho-prolifératif massif des souris CTLA-4 déficientes; PD-1 (Programmed Death-one) exprimé sur les cellules T, B et macrophages activés; et finalement, le BTLA (B and T lymphocyte Attenuator) exprimé par les cellules B activées, et les cellules devenant Th1 et Th2.

Les mécanismes par lesquels toutes ces molécules inhibitrices fonctionnent sont principalement dus au recrutement des motifs d'inhibition « immunotyrosine-based inhibitory motif » (ITIMs) et à la signalisation via des phosphatases (SH2, SHP-1, SHIP et PTEN), des adaptateurs (Gab2, SLAP) ainsi que des ligases d'ubiquitine (Cbl) (Leibson, 2004).

La liste des molécules potentiellement inhibitrices peut aussi inclure: CD5, CD22, PIRB1-5, LAIR-1, NKB1 A/C/E/F/G, NKG2-A/B, CD66, CD72, SIRP- α 1, ILT1-5, MIR7, hMIR (HM9), CD95 (Fas), TGF β -R, TNF-R1, IFN γ -R (chaines α et β), H2-M, HLA-DM, CD1, CD1-d, CD46, c-cbl, Pyk2/FADK2, PGDF-R, LIF, LIF-R, CIS, SOCS13,5 et DRAK2 (Sinclair, 1999; Okazawa, 2005)

Récemment, par entre autres sa liaison au SIRP-alpha, le CD47 s'ajoute sur la liste de paires de molécules immuno-régulatrices. Les différentes fonctions assurées par les interactions du CD47 avec ses ligands démontrent un potentiel intéressant dans la régulation des réactions immunitaires, et méritent une investigation plus profonde.

I.9. La molécule CD47

I.9.a. Définition, expression et Ligands

Le CD47 aussi nommé IAP « Integrin Associated Protein » à cause de son association physique et fonctionnelle aux intégrines $\alpha v\beta 3$, $\alpha IIb\beta 3$ et $\alpha 2\beta 1$, est une protéine de surface de 50 KD, fortement glycosylée, possédant 5 domaines transmembranaires, un domaine extracellulaire qui appartient à la famille des immunoglobulines (IgV) et une courte queue intracytoplasmique (Cooper, 1995).

Le CD47 est ubiquitaire, donc exprimé sur les cellules hématopoïétiques et non hématopoïétiques de l'organisme (Reinhold , 1997).

Cette molécule interagit *en cis* avec les intégrines; *en trans* elle sert de récepteur pour la thrombospondine TSP-1 et de ligand pour deux membres de la famille des SIRPs « signal regulatory protein » SIRP-alpha et SIRP-gamma.

La Thrombospondine, TSP-1, appartient aux protéines de la matrice extracellulaire, est produite par les plaquettes, les monocytes et les macrophages alvéolaires et est fortement exprimée mais de façon transitoire dans les tissus endommagés au cours de la réaction inflammatoire (Avice, 2000). Les SIRPs, représentent une famille de paires de récepteurs inhibiteurs/activateurs qui diffèrent entre eux par la présence ou l'absence de motifs d'inhibition ITIMs (Seiffert, 2001). SIRP- α , un récepteur inhibiteur, est exprimé sur les cellules myéloïdes, les neurones et peut se trouver sur les cellules endothéliales et une sous population de lymphocytes B. SIRP- γ , aussi dit SIRP- $\beta 2$, récemment identifié, est exprimé par les lymphocytes T et les cellules NK activées, et ne possède pas de motifs ITIMs (Oldenborg, 2005).

I.9.b. Rôle du CD47 dans la régulation de la réponse immune

Le fait d'être exprimé sur toutes les cellules de l'organisme et de posséder de multiples ligands, complique l'identification d'un rôle clair et précis du CD47 dans les réactions immunitaires; ainsi différents effets immuno-régulateurs ont été rapportés en fonction du ligand impliqué et de la population cellulaire étudiée.

- L'interaction *en cis* du CD47 avec différentes intégrines résulte en une signalisation qui implique le recrutement des protéines G et qui peut moduler l'adhérence et la migration cellulaire. Le premier rôle du CD47 dans la modulation de la migration cellulaire a été démontré dans le chimiotaxisme transendothélial des neutrophiles. *In vitro*, des anticorps monoclonaux contre CD47 inhibent la migration des polynucléaires (PMNs) à travers la lignée cellulaire intestinale humaine T84 et ce de manière bidirectionnelle (Cooper, 1995; Parkos, 1996). *In vivo*, les souris CD47^{-/-} succombent rapidement à une péritonite bactérienne par *E.coli* et ce par un ralentissement de la migration des neutrophiles (Gresham, 2000; Lindberg, 1996; Rebres, 2005).
- Sur les globules rouges, et possiblement sur toutes les autres cellules, le CD47 est identifié comme un marqueur de soi. Chez la souris, les globules rouges qui n'expriment pas cette molécule sont rapidement éliminés de la circulation par les macrophages de la rate. Dans ce contexte le CD47 sur les globules rouges par sa liaison avec SIRP- α sur les macrophages et les cellules dendritiques inhibe la fonction phagocytaire de ces dernières et contribue à la protection du soi (Okazawa, 2005; Oldenborg, 2000; Olsson, 2006).
- Un rôle de *feedback* négatif *in vitro* est attribué à l'engagement du CD47 par la TSP-1 ou l'anti-CD47 monoclonal. Il se traduit par une inhibition de la sécrétion d'IL-12 par les monocytes, ainsi qu'une inhibition de la maturation et de l'activation des cellules dendritiques (Armant, 1999; Demeure, 2000).

- Récemment un rôle du CD47 dans la biologie des cellules dendritiques *in vivo* était démontré. Les souris CD47^{-/-} présentent une réduction sélective d'une sous-population de DC de la rate (les CD11c^{hi} CD11b^{hi} CD8α⁻ CD4⁺ ou DCs de la zone marginale). En périphérie, le nombre de DCs épidermiques était normal alors que leur migration de la peau vers les ganglions drainant est diminuée (Hagnerud, 2006).
- La liaison CD47/TSP est aussi responsable de l'induction d'une mort cellulaire programmée type III caspase-indépendante des cellules lymphoïdes à l'exception des DCs (Mateo, 1999; Pettersen, 1999). Cette mort résulte d'une diminution dramatique des niveaux intracellulaires d'AMP cyclique (Manna, 2003).
- Sur les lymphocytes T, où l'expression du CD47 atteint son niveau le plus élevé, des effets opposés de costimulation et d'inhibition ont été simultanément rapportés; l'activation des lymphocytes T périphériques humaines (PBL) par de faibles doses de l'anti-CD3 combinées avec différents anticorps monoclonaux anti-CD47 se traduit par la prolifération accrue des cellules activées de manière dépendante du CD3, mais indépendante du CD28 et des intégrines (Reinhold, 1997; Ticchioni, 1997). Dans les conditions inflammatoires telles les synovites rhumatoïdes, l'interaction CD47/TSP-1 fournit un signal nécessaire pour l'activation des lymphocytes T autoréactifs (Vallejo, 2000). D'autre part, plusieurs effets inhibiteurs ont été décrits dans différentes conditions expérimentales: 1) l'engagement du CD47 par la TSP ou l'anticorps monoclonal inhibe la différenciation des lymphocytes T naïfs en effecteurs de type Th1 même en présence de cytokines polarisantes exogènes comme l'IL-12 (Avicé, 2000); 2) Cette liaison possède aussi un effet anti-prolifératif, antagoniste au TCR et inhibe la stimulation des cellules *Jurkat* et des cellules humaines primaires par l'anti-CD3 résultant en une suppression de l'expression des marqueurs d'activation CD69, egr-1 et PAC-1 (Li, 2001; Li, 2002); 3) l'engagement primaire

par les anti-CD47 sur des cellules naïves de sang de cordon (PBMcs) résulte en un état d'anergie caractérisé par une forte suppression de l'expression du CD25 et de la sécrétion d'IL-2 durant la culture primaire, une absence de réponse à la re-stimulation par CD3, CD28 ou par IL-2, IL-4 et IL-12 accompagnée d'une prolifération très réduite plus une incapacité à sécréter les cytokines Th1 ou Th2 (Avice, 2001). Des effets opposés résultent aussi des interactions entre le CD47 et les SIRPs; la liaison CD47/SIRP- α pendant l'interaction entre les lymphocytes T et les APCs induit une inhibition bidirectionnelle des deux compartiments cellulaires (Latour, 2001); alors que l'engagement du SIRP- β 2 sur les cellules T par le CD47 sur les APCs favorise la prolifération T spécifique à l'antigène (Oldenborg, 2005).

- Finalement, un rôle du CD47 dans l'induction de cellules T humaines suppressives était démontré *in vitro*. La stimulation de lymphocytes T naïves ou mémoires en présence de la TSP-1 (ligand du CD47 fortement exprimée dans les tissus inflammatoires ou endommagés) ou de l'anti-CD47 monoclonal transforme ces cellules en cellules régulatrices appelées Tas (cellules T anergiques et supresseurs), capables d'inhiber l'activation des cellules Th0, Th1 et Th2. Les Tas expriment Foxp3 mais diffèrent des Treg naturels par le fait qu'elles soient CD25^{lo}, CD103⁻ et Granzyme B^{neg} (Grimbert, 2006).

I.10. Objectifs du travail

Des études antérieures ont montré le rôle du CD47 dans l'induction des lymphocytes T anergiques et suppresseurs (Tas) *in vitro* chez l'humain. L'activation de cellules T naïves en présence de la TSP-1 induisait des cellules suppressives qui possédaient cependant un phénotype différent des Treg naturels (Grimbert, 2006). La conversion périphérique de Lc T naïfs ou mémoires en Tas ne nécessitait pas la présence de Treg naturels. Néanmoins, les conséquences de l'engagement du CD47 sur le phénotype et la fonction des Treg naturels n'avaient pas été étudiées *in vitro*.

Pour mieux comprendre l'importance du CD47 dans le contrôle de l'induction de tolérance *in vivo*, nous avons choisi d'investiguer son rôle potentiel dans le développement, le maintien et la fonction des lymphocytes T régulateurs naturels. Pour répondre à ces interrogations, l'étude est basée sur l'analyse des propriétés des lymphocytes T régulateurs naturels ainsi que de leurs cibles (les $CD4^+CD25^-$) dans un modèle murin qui compare des souris $CD47^{-/-}$ avec des souris de type sauvage. Les paramètres questionnés sont: la fréquence des Treg dans le thymus et les organes lymphoïdes périphériques, leur phénotype ainsi que leur fonction suppressive *in vitro* et *in vivo*.

De plus en plus d'études tendent à montrer une différence dans le comportement des lymphocytes entre jeunes et vieilles souris (Eaton, 2004; Haynes, 2003; Miller, 1996; Shimizu, 2003). Nous nous sommes donc intéressés à faire un suivi de la plupart des paramètres étudiés en fonction du vieillissement des souris. Dans ce contexte, nos résultats seront discutés par rapport à ce qui est rapporté dans la littérature et qui montre une liaison étroite entre l'activation des lymphocytes T et la génération des Treg.

Un rôle important des Treg dans la modulation des réactions immunitaires est établi et la découverte de molécules impliquées dans la biologie de ces cellules sera d'une nécessité pour toute éventuelle considération d'usage clinique ou thérapeutique.

Section II

Matériels et méthodes

II.1. Model animal

Le rôle du CD47 est évalué dans un modèle animal de souris de fond génétique (background) Balb/C, par des études comparatives entre des souris du type sauvage (Balb/C WT) et celles doublement déficientes pour CD47 (CD47^{-/-}); Ces souris sont croisées et élevées dans les facilités de l'animalerie du CHUM, campus Notre Dame, dans la zone SPF (Zone exempte de certains pathogènes qui représentent un danger pour les animaux immunodéficients)

II.2. Préparation des suspensions cellulaires

Les souris ont été sacrifiées par dislocation cervicale. Les organes ont par suite été prélevés sous une hotte stérile, recueillis dans des tubes pré identifiés avec 5 ml de milieu de culture et gardés sur glace. Pour obtenir une suspension cellulaire homogène, les organes ont été écrasés délicatement et filtrés par plusieurs passages à travers des filtres stériles (70µm cell strainer, BD Falcon, Franklin Lakes, New Jersey).

Le milieu de récupération utilisé dans cette étape est le même utilisé pour les cultures cellulaires: du RPMI 1640 (Multicell, Wisent Inc., Saint-Jean-Baptiste de Rouville, Québec) supplémenté avec 10% de sérum de bœuf fœtal (FCS), 1% Hepes, 0.1% 2-mercaptoethanol et des antibiotiques pénicilline et streptomycine.

Pour enrichir en cellules lymphoïdes, les préparations de rate ont subi une lyse de l'excès de globules rouges par la solution stérile de Gey (NH₄Cl, pH=7.2). Ce traitement consiste à incuber les préparations cellulaires dans 3ml de la solution de Gey pendant 5 minutes à 4 °C. Un volume de 5 ml de milieu de culture était ensuite

rajouté pour laver les cellules par une étape de centrifugation de 7 minutes à 1200 RPM. Après centrifugation, les cellules ont été resuspendues dans 5 ml de milieu de culture et des comptes cellulaires ont été réalisés.

La plupart des comptes cellulaires ont été effectués par dilution cellulaire dans la solution Türk (0.01% Crystal violet dans 3% acide acétique), suivi d'un décompte performé au microscope optique en utilisant un hemocytomètre Neubauer. Certains comptes ont été effectués par cytométrie de flux avec des microbilles de compte (Beckman Coulter, Fullerton, Californie).

II.3. Marquages cellulaires *ex vivo*

Les cellules de la rate, de ganglions lymphatiques périphériques ou du thymus ont été distribuées dans des plaques de 96 puits à fond en v (Sigma-Aldrich, St Louis, Missouri) dans l'ordre d'un million de cellules par puits. Les cellules ont été par suite lavées 2 fois avec un tampon de Facs (PBS 1x supplémenté de 2% FCS et 0.05% Azide). Les marquages, avec les anticorps de surface correspondants en quantité saturée, étaient réalisés dans un volume total de 50 µl du même tampon pendant 30 minutes à 4 °C, dans un endroit obscur. Après cette incubation, les cellules ont été lavées deux fois avec 100 µl par puits de tampon de Facs (3 minutes à 3000 RPM à 4 °C), et les échantillons ont été transférés dans des petits tubes pour l'acquisition au FACS dans un volume total de 300 µl du même tampon.

Les marquages avec des anticorps biotinylés ont été révélés par une deuxième étape de marquage par la streptavidine-APC pendant 30 minutes à 4°C au sombre, puis deux lavage avec le tampon de Facs priori à l'acquisition.

Un maximum de quatre couleurs par combinaison a été effectué. Les anticorps antiCD44-Biot (IM7.8.1) et antiCD62L-Fitc (MEL-14), ont été produits et couplés sur place. Les anticorps antiCD4-PercP (RM4-5), antiCD25-FITC (7D4), antiCD69-PE (H1.2F3), antiCD103-Biot (M290), antiCD127-PE (SB/199), antiICOS-PE (CD278, 7E.17G9) et antiCCR7- PE (4B12) ont été procurés de chez

BD Biosciences (San Jose, Californie). L'antiCD25-PE (PC61.5.3) a été procuré de chez Caltag (Burlington, Ontario).

II.4. Cytométrie de flux et analyse par Cellquest

L'acquisition des marquages a été réalisée sur un système de FACS Calibur (Bekton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey). Le réglage des intensités des fluorochromes a été effectué à l'aide des contrôles positifs constitués d'échantillons marqués par une simple couleur et des contrôles négatifs constitués par des échantillons marqués par l'isotype contrôle correspondant. Avant d'acquérir, il était primordial de s'assurer que les cellules viables apparaissent dans leur fenêtre appropriée (forward FSCH et side scatters SSCH), les cellules non marquées soient négatives dans toutes les fenêtres (FL-1, FL-2, FL-3 et FL-4) et d'éliminer par compensation toute interférence entre les différentes couleurs. Un nombre fixe et égal de cellules enregistrées pour WT et CD47^{-/-} est respecté dans tous les marquages. Les analyses ont été effectuées à l'aide du logiciel Cellquest (BD). L'approche utilisée pour chacune des analyses est expliquée dans la section des résultats correspondants.

II.5. Marquages intra cytoplasmiques

Des marquages intra cytoplasmiques pour Foxp3 et IFN γ ont été réalisés selon les protocoles et avec les réactifs fournis par chacun des fournisseurs (anti-Foxp3 eBiosciences, San Diego, Californie) et (Cytofix/Cytoperm pour cytokines, BD, San Jose, Californie). Brièvement, les cellules ont été marquées pour les anticorps de surface tel que décrit dans la section précédente dans des plaques de 96 puits. Après le marquage de surface, les cellules ont été lavées avec du tampon de FACS, puis soit fixées dans les mêmes plaques pour IFN γ ou transférées dans des tubes pour Foxp3. La fixation pour le marquage IFN γ a été réalisée par une incubation de

20 minutes à 4°C dans 100 µl de la solution cytofix, celle pour Foxp3 par une incubation de 30 minutes à 4°C dans 1 ml de la solution de fixation correspondante. Après la fixation, deux étapes de lavage (3000 RPM à 4 °C) avec 100 µl du tampon perm/wash pour IFN γ et 2ml du tampon de lavage correspondant pour Foxp3 afin de perméabiliser les cellules. Par la suite, les cellules ont été bien resuspendues et marquées avec la quantité déterminée de l'anticorps correspondant (anti-IFN γ ou anti-Foxp3) dans le même tampon perm/wash pendant une incubation de 30 minutes à 4°C dans le sombre.

II.6. Purifications cellulaires

Les lymphocytes T régulateurs ainsi que leurs cibles les CD4⁺ effecteurs ont été purifiés à partir de rate de souris WT ou CD47^{-/-} par la procédure de purification immuno-magnétique selon le protocole EasySep (StemCell technologies, Vancouver). Après traitement des cellules de rates à la solution de Gey (NH₄Cl pour lyser les globules rouges), ces cellules subissaient une première étape de purification afin d'obtenir les CD4⁺. La première étape était réalisée par enrichissement en CD4⁺ « sélection négative ». Les cellules totales de la rate ont été marquées avec un mélange d'anticorps biotinylés dirigés contre les populations cellulaires CD4⁻. Ce marquage consiste à incuber les cellules à une concentration cellulaire de 10⁸ cellules par ml dans du PBS stérile avec la quantité nécessaire du mélange d'anticorps pendant 15 minutes à température ambiante. Les anticorps utilisés pour éliminer les populations CD4⁻ sont : CD11b contre les macrophages et les DCs, CD8 contre les lymphocytes T CD8, B220 contre les lymphocytes B, GR1 contre les Neutrophiles et les Granulocytes, TER119 contre les érythrocytes et DX5 contre les cellules NK. Un second anticorps de sélection anti-biotine a été ensuite ajouté (10 minutes d'incubation à température ambiante), suivi par l'ajout de nanoparticules magnétiques qui se lient aux complexes déjà formés (10 minutes d'incubation à température ambiante). Finalement les complexes formés ont été

séparés du mélange par trois passages répétitifs de cinq minutes dans un champ magnétique (aimants StemCell). Les $CD4^+$ obtenues dans cette étape ont servies pour les études de $CD4^+$ totaux *in vitro* ou bien ont subies une deuxième étape de purification pour obtenir les $CD4^+CD25^+$ servant à l'étude de la fonction suppressive des Treg *in vitro*. Pour purifier les Treg, les $CD4^+$ obtenues par la première sélection négative ont été marquées avec l'anti- $CD25$ -PE suivi par les anticorps de sélection anti-PE puis les nanoparticules. Deux sélections magnétiques (positive et négative) ont été ensuite pratiquées afin de séparer les $CD4^+$ en fonction de l'expression ou non du $CD25$. Pour optimiser la pureté des $CD4^+CD25^+$ cette fraction cellulaire a subis cinq passages répétitifs à travers le champ magnétique. Les puretés des cellules ainsi purifiées $CD4^+$, $CD4^+CD25^+$ ou $CD4^+CD25^-$ ont été vérifiées par la cytométrie de flux. La pureté des $CD4^+$ se situe autour de 93%, celle des $CD4^+CD25^-$ est $\geq 90\%$ et celle des $CD4^+CD25^+$ autour de 80% et les puretés entre WT et $CD47^{-/-}$ sont très comparables dans chaque expérience.

II.7. Préparation des APCs

Les APCs utilisées dans les cocultures ainsi que dans toutes les autres cultures sont des cellules B mithomycinées préparées à partir de rate de souris WT. Les cellules B ont été obtenues par enrichissement avec des anticorps éliminant les $CD4$ et les $CD8$, suivant le même protocole EasySep décrit antérieurement. Les cellules B ont été par suite traitées à la mithomycine C (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri) (Nishibori, 2003). Cet antibiotique issu de *Streptomyces caespitosus* rend les cellules B anergiques grâce à une action alkylante de l'ADN. Ce traitement est constitué d'une incubation des Lc B avec 50 $\mu\text{g/ml}$ de mitomycine C dans un milieu de culture exempt de FCS pendant 30 minutes à 37° C suivi de deux lavages avec du milieu de culture complet pour arrêter la réaction.

II.8. Essai de suppression *in vitro*

Pour apprécier la fonction suppressive des Treg *in vitro*, le test de suppression standard « coculture » a été suivi. Protocol modifié à partir de Thornton, 2004. Il s'agit d'une culture de $CD4^+$ effecteurs $CD4^+CD25^-$ réalisée en présence de l'antigène, des APCs et des Treg. L'antigène utilisé est l'anti-CD3 soluble (145-2C11 de BD). Les essais de cocultures ont été faits en duplicata dans des plaques de 96 puits à fond rond, avec 5×10^4 $CD4^+CD25^+$, 5×10^4 $CD4^+CD25^-$, 5×10^4 APCs et $1 \mu\text{g/ml}$ αCD3 . Une incubation de 72 heures à 37°C est nécessaire avec l'addition de la thymidine [^3H] pendant les 6 dernières heures de la culture. Des puits contrôles nécessaires ont été réalisés dans chaque expérience: les APCs seules et avec αCD3 pour s'assurer que le traitement à la mitomycine C est réussi et qu'il s'agit de cellules qui ne prolifèrent pas en présence de l'antigène; les cellules cibles $CD4^+CD25^-$ avec ou sans l' αCD3 et des APCs pour s'assurer du niveau de prolifération de base de ces cellules en réponse à l'antigène; les Treg seuls avec ou sans l' αCD3 et des APCs pour vérifier l'anergie des Treg dans nos conditions de culture. Dans certaines expériences une titration autologue du ratio Treg/cellules cibles est effectuée; dans d'autres un inversement hétérologue entre WT et $CD47^{-/-}$ est effectué (en cultivant des cibles WT avec des Treg $CD47^{-/-}$ et vice versa).

II.9. Mesure de la prolifération cellulaire

Pour mesurer la prolifération cellulaire, la technique d'incorporation de la thymidine radioactive ^3H a été suivie. La thymidine (Amersham/Biosciences, Sunnyvale Californie) a été rajoutée aux cultures cellulaires dans les 6 dernières heures à une concentration finale d' $1 \mu\text{Ci}$ par puits (0.037 MBq). Après le délai d'incubation en présence de la Thymidine, les cellules ont été éclatées par des lavages répétitifs à l'eau puis récupérées par un système de récolte sur des filtres. Les filtres portant le matériel d'ADN radioactif ont été placés dans des tubes contenant 2 ml de liquide à

scintillation qui sert à transformer les rayonnements ionisants en lumière détectable et quantifiable. La quantification a été faite dans un compteur à liquide de scintillation (1217 Rack beta).

II.10. Stimulation cellulaire

Pour évaluer *in vitro* les fonctions des cellules effectrices WT vs CD47^{-/-}, des cultures de CD4⁺ totaux ou de CD4⁺CD25⁻ ont été réalisées dans deux conditions expérimentales différentes: dans des plaques de 96 puits à fonds ronds avec de l'anti-CD3 soluble en présence d'APCs mitomycinées de rate ou dans des plaques 96 puits à fonds plats avec l'anti-CD3 enduit (les plaques enduites ont été incubées pendant 18 heures avec 100 µl/puits des concentrations indiquées d'anti-CD3 dilué dans du PBS stérile à 4°C; avant la mise en culture ces plaques ont été lavées deux fois avec du milieu de culture). Les cellules ont été distribuées à une concentration de 1×10^5 par puits dans un volume total de 200 µl de milieu de culture par puits. Du surnageant de culture a été récupéré à différents moments de cinétique 24, 48 ou 72 heures pour doser diverses cytokines. Des puits contrôles non stimulés (sans anti-CD3) ont été réalisés pour montrer que l'activation était dépendante de l'addition de cet antigène.

II.11. Dosage des cytokines par ELISA

Les cytokines IL-2, IL-10 et IFN γ ont été mesurées dans les surnageants de culture par ELISA commerciales, technique sandwich, (BD OptEIA ELISA Sets) selon le protocole du fournisseur. Brièvement, les microplaques de 96 puits pour ELISA ont été enduites d'anticorps primaire (anticorps de capture) pendant une nuit à 4°C à la concentration et dans le diluant recommandés par le fabricant. Le lendemain, les excès d'anticorps non fixés ont été éliminés par plusieurs lavages avec un tampon de PBS 1X supplémenté de 0.1% Tween 20. Les plaques ont été par suite incubées

pendant une heure à température ambiante dans un tampon de PBS 1X avec 10% FBS pour bloquer les sites non spécifiques. Après lavages, les échantillons à doser et les standards dilués dans le tampon PBS 1X avec 10% FBS ont été distribués dans leurs puits respectifs et les plaques bien recouvertes ont été incubées pendant une nuit à 4°C. Les excès de protéines non fixés ont été éliminés par des lavages répétitifs. Des anticorps secondaires (anticorps de détection) conjugués avec une enzyme « SAV-HRP » ont par suite été rajoutés pendant une incubation d'une heure à température ambiante suivie de plusieurs autres lavages pour enlever tout excès de produit. La réactivité des tests a été révélée par l'ajout d'un substrat chromogène, le TMB, reconnu par la SAV-HRP déjà fixée sur les complexes immuns. Cette dernière incubation est d'une durée approximative de 30 minutes. Les réactions ont été arrêtées par l'ajout d'une solution de H₂SO₄ 1M. Les lectures des absorbances ont été effectuées à l'aide d'un lecteur de microplaques à une longueur d'onde de 450 nm. (Bio-Rad microplate reader)

II.12. Déplétion ou inactivation des T régulateurs *in vivo*

La déplétion ou l'inactivation des Treg *in vivo* (Kohm, 2006) a été réalisée au jour -3 par une seule injection de 500 µg d'anticorps monoclonal anti-CD25 par voie intraveineuse ou 1 mg de ce même anticorps par voie intrapéritonéale. L'anti-CD25 utilisé est un rat IgG1 clone PC61 qui a été préparé sur place à partir d'une culture d'hybridome (filtré sur une colonne de protéine G, élu avec de la Glycine 0.1 M pH 3.0 et dialysé contre du PBS stérile 1x sans Azide). L'efficacité de la déplétion a été vérifiée trois jours post-injection (jour zéro) dans la rate, les ganglions périphériques ou dans un prélèvement sanguin, par un marquage CD4 CD25 avec un clone anti-CD25 différent du PC61, tel que le 7D4 (BD Biosciences, San Jose, Californie).

II.13. Immunisation

L'immunisation sous cutanée a été réalisée au jour zéro après déplétion dans chacune des paumes de pattes des souris, avec 25 µg ovalbumine protéine OVA (Sigma) et 1 µg LPS (origine *E. coli*) préparés par émulsion dans une solution de 100 µg/ml de l'adjuvant incomplet de Freund (MP Biomedicals, Allemagne). L'émulsion a été réalisée en mélangeant ensemble 500 µl de la solution d'adjuvant incomplet de Freund avec 500 µl de la dilution contenant l'OVA et le LPS. Un volume approximatif de 20 µl de cette émulsion a été injecté. Les souris contrôles non immunisés ont reçus des injections de PBS stérile.

II.14. Restimulation *in vitro*

Les souris ont été sacrifiées au jour 7 post immunisation (jour 11 post déplétion) et les ganglions drainant du site d'immunisation (ganglions poplités) ont été prélevés. Les cellules totaux des ganglions poplités ont été marquées aux CFSE priori à une restimulation *in vitro* avec l'ovalbumine afin d'analyser leur prolifération et leur sécrétion de cytokines. Le marquage au CFSE permet l'appréciation de la prolifération cellulaire et l'identification des divisions successives par cytométrie de flux.

II.14.a. Marquage CFSE

Avant de procéder au marquage, les cellules ont été lavées deux fois avec du PBS stérile 1x. Les cellules (10^6 /ml) ont par suite été incubées avec une concentration finale de 5 µM CFSE (Renovar, Madison, Wisconsin) dans du PBS stérile 1x pendant 15 minutes à 37°C. La réaction a été bloquée avec 2% FCS, puis trois lavages avec du milieu de culture pour éliminer tout excès du colorant.

II.14.b. Restimulation avec OVA

Les cellules de ganglions marquées au CFSE, ont été mises en culture à une concentration de 8 million/ml dans un volume total de 200 µl par puits, dans des plaques de 96 puits à fonds plats, avec 500 µg/ml d'OVA protéines. Les cultures ont été incubées à 37 °C pour une durée de 72 heures.

II.14.c. Marquage intracytoplasmique pour Cytokines

La sécrétion de cytokine par les cellules en culture a été inhibée par l'ajout d'une solution bloquante (Golgi stop, BD) à une concentration finale de 0.66 µl/ml pendant les quatre dernières heures d'incubation. Les cellules ont par suite été récupérées et marquées en surface par l'anti-CD4 puis fixées, perméabilisées et marquées en intracytoplasmique par l'anti-IFN γ (BD) tel que décrit dans la section II.5.

II.15. Statistiques

Les niveaux de signification de certains résultats sont confirmés par un student T test (unpaired, tow tailed T test). Les valeurs $p < 0.05$ sont considérées significatives. L'utilisation d'autre test statistique est mentionnée là où c'est le cas.

Section III :

Résultats

III.1. Analyse du rôle du CD47 sur la fréquence des CD4⁺CD25⁺ dans le thymus et la rate de jeunes souris

La fréquence des Treg est un paramètre important dans le maintien de l'homéostasie *in vivo*; nous avons donc vérifié en premier lieu si cette fréquence est affectée par l'absence du CD47. Dans ce but, nous avons analysé par des doubles marquages (CD4/CD25) la proportion et le nombre absolu des cellules CD25⁺ parmi les cellules CD4⁺ dans le thymus et la rate de souris âgées de 8 à 10 semaines. Les nombres absolus sont obtenus en multipliant chacun des pourcentages par le compte cellulaire de l'organe désigné. Comparativement, dans ce groupe d'âge, les pourcentages de cellules CD25⁺ parmi les CD4⁺ du thymus ou de la rate ne sont pas différents entre souris WT et CD47^{-/-}. En nombre absolu de CD4⁺CD25⁺, des diminutions significatives sont observées chez les CD47^{-/-} et ceci est la conséquence de la cellularité réduite du thymus et de la rate chez les souris CD47^{-/-} par rapport aux souris du type sauvage Balb/C (WT).

Une analyse représentative du pourcentage des cellules CD4⁺ CD25⁺ du thymus et de la rate de jeune souris est montrée dans la figure 3. Les moyennes des comptes cellulaires, des nombres de CD4⁺, des proportions de CD25⁺ parmi les CD4⁺ et des nombres absolus de CD25⁺ sont montrées dans la figure 4 pour le thymus et la figure 5 pour la rate.

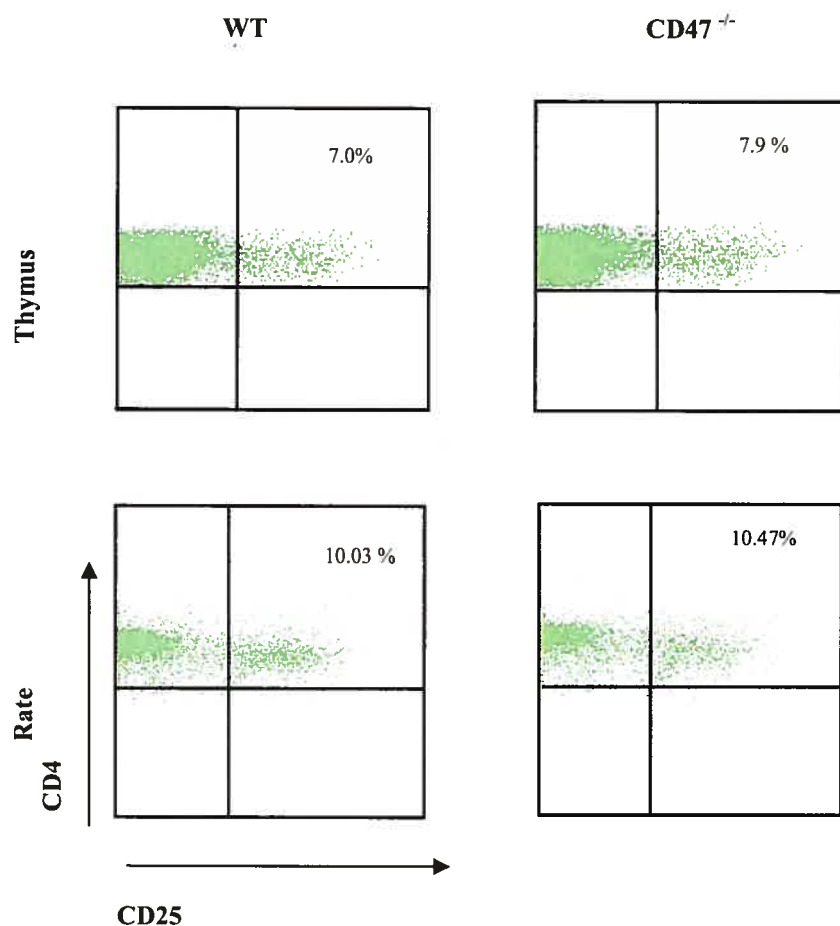


Figure 3. Les pourcentages de Lc CD25⁺ parmi les CD4⁺ de jeunes souris CD47^{-/-} dans le thymus et la rate (8-10 semaines)

Des représentations « dot-plots » de FACS de doubles marquages CD4 et CD25, de souris âgées de 8-10 semaines, analysées dans une fenêtre combinant R1 et R2 (R1: les cellules viables et R2: les CD4⁺ du thymus ou les CD4⁺ de la rate).

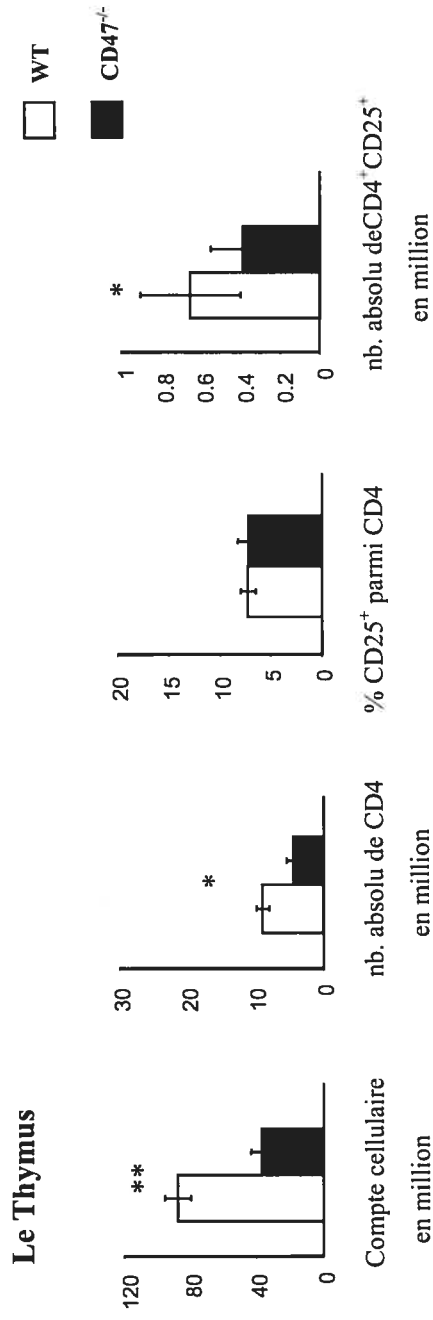


Figure 4. Les proportions des CD4⁺ et D4⁺CD25⁺ dans le thymus de jeunes souris CD47^{-/-}.

Dans le groupe d'âge de 8 à 10 semaines, la cellularité réduite du thymus de souris CD47^{-/-} se traduit par une réduction du nombre absolu des CD4⁺ SP et celui des CD4⁺CD25⁺. Le pourcentage de CD25⁺ parmi les CD4⁺ SP reste comparable à celui des souris contrôles WT. Représentation de la moyenne \pm SEM de 8 souris par génotype. (stats: * $p = 0.05-0.01$; ** $p < 0.01$)

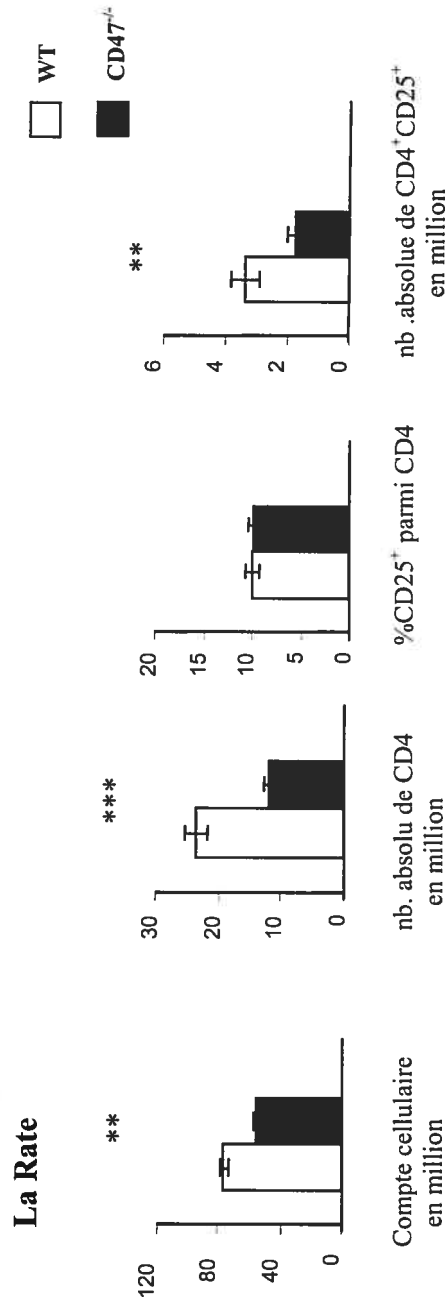


Figure 5. Les proportions des CD4⁺ et CD4⁺CD25⁺ dans la rate de jeunes souris CD47^{-/-}.

Dans le groupe d'âge de 8 à 10 semaines, la cellularité réduite des rates des souris CD47^{-/-} se traduit par une baisse du nombre absolu de CD4⁺ et de CD4⁺CD25⁺. Le pourcentage de CD25⁺ parmi les CD4⁺ reste pareil entre souris CD47^{-/-} et WT. Représentation de la moyenne ± SEM de 8 souris par génotype. (stats: ** p < 0.01 ; *** p < 0.001)

III.2. Suivi des proportions des $CD4^+$ et des $CD25^+$ en fonction de l'âge chez les souris $CD47^{-/-}$

Un nombre d'études récentes démontraient des changements dans les fonctions des lymphocytes chez les vieilles souris, d'autres révélaient une accentuation de certaines manifestations auto-immunes avec le vieillissement des souris. Dès lors nous avons vérifié les proportions des présumées Treg, donc des $CD4^+CD25^+$, en fonction de l'âge des souris $CD47^{-/-}$.

Dans le thymus, le pourcentage des Lc T $CD25^+$ parmi les $CD4SP$ reste comparable entre Balb/C et $CD47^{-/-}$ chez les souris plus vieilles jusqu'à l'âge de 20 semaines (observations de S. Lesage, résultats non montrés); une réduction de la cellularité thymique existe dès le jeune âge chez les souris $CD47^{-/-}$ comparativement aux souris Balb/C. Cette réduction cellulaire se rajoute à l'atrophie thymique naturelle du vieillissement et complique l'interprétation des résultats dans le thymus des souris $CD47^{-/-}$ âgées de plus de 30 semaines. En périphérie, les analyses démontrent une baisse de 30% de la cellularité dans la rate des souris $CD47^{-/-}$ dès l'âge de 8 semaines (figure 5). De manière parallèle, le pourcentage des Lc $CD4^+$ est aussi diminué de 30% dès 8 semaines dans la rate et se stabilise au cours du vieillissement. Dans les ganglions périphériques, la même diminution du pourcentage des $CD4^+$ apparaît à partir de 12 semaines. Cette diminution est accompagnée, dans la rate ainsi que dans les ganglions des souris $CD47^{-/-}$, d'une augmentation de la proportion des cellules $CD25^+$ parmi les $CD4^+$ périphériques. L'augmentation du pourcentage des $CD25^+$ observable à partir de l'âge de 11 semaines s'accroît significativement dans les semaines, voir les mois qui suivent. Des doubles marquages $CD4$ et $CD25$ sont effectués sur des souris appartenant à différents groupes d'âge sur des cellules de rates et de ganglions périphériques et les résultats sont montrés dans la figure 6.

Parallèlement, à l'augmentation du pourcentage des $CD25^+$ chez les souris $CD47^{-/-}$, une augmentation faible mais significative du pourcentage des $CD25^+$ parmi les $CD4^+$ dans la rate et les ganglions périphériques des souris du type sauvage Balb/C est

observée ($p < 0.05$). Une pareille observation est rapportée chez les souris âgées C57BL/6 dans une étude récente de Sakaguchi (Nishioka, 2006).

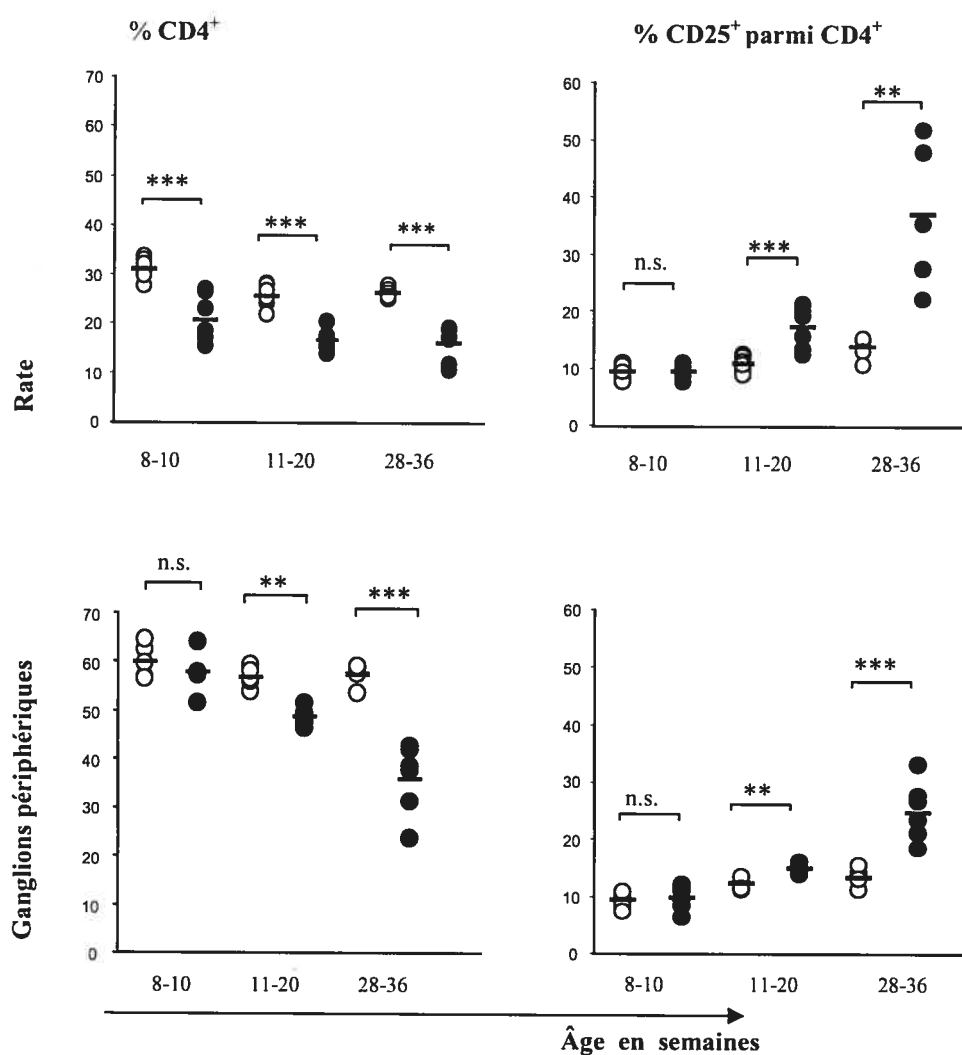


Figure 6. Les pourcentages de cellules CD4⁺ et de cellules CD25⁺ dans la rate et les ganglions périphériques des souris CD47^{-/-} en fonction de l'âge. Au cours du vieillissement, les souris CD47^{-/-} présentent une diminution du pourcentage des CD4⁺ accompagnée d'une augmentation du pourcentage des CD25⁺ parmi les CD4⁺ périphériques. Les résultats analysés dans la rate et les ganglions périphériques sont représentés en fonction de 3 groupes d'âge de souris WT et CD47^{-/-}. Les moyennes sont indiquées par les barres horizontales. ○ WT ; ● CD47^{-/-}

n = 5 à 11 souris par groupe. (stats: ** p < 0.01 ; *** p < 0.001)

III.3. Analyse des sous populations de $CD4^+CD25^+$ en absence du CD47 en fonction de l'âge

Les Treg sont constituées de deux sous-populations en fonction de leur état d'activation: les Treg naïves ou au repos et les Treg activées. Elles se distinguent principalement par l'expression du CD44 et/ou du CD62L. La sous-population au repos appartient aux cellules $CD4^+CD25^+CD62L^{hi}CD44^{lo}$, celle activée appartient aux cellules $CD4^+CD25^+CD62L^{lo}CD44^{hi}$ (Fisson, 2003).

Sachant que le CD47 est impliqué dans l'activation des lymphocytes T, on s'est donc intéressé à vérifier l'état d'activation ainsi que les proportions des sous-populations de lymphocytes $CD4^+CD25^+$ chez les différents groupes d'âges de souris $CD47^{-/-}$ (figure 8). Les résultats démontrent que l'augmentation du pourcentage des cellules $CD25^+$ parmi les Lc $CD4^+$ chez les souris $CD47^{-/-}$ est due principalement à une augmentation de la sous-population activée $CD4^+CD25^+CD44^{hi}$ dans la rate aussi bien que dans les ganglions périphériques chez les souris âgées, alors que la proportion de la sous-population naïve $CD4^+CD25^+CD44^{lo}$ reste presque stable. D'autre part, le pourcentage des cellules mémoires $CD4^+CD25^-CD44^{hi}$ est faiblement augmenté chez les souris $CD47^{-/-}$ pendant que celui des cellules naïves $CD4^+CD25^-CD44^{lo}$ est diminué en conséquence à l'augmentation des $CD4^+CD25^+CD44^{hi}$. L'augmentation des cellules $CD4^+CD25^+CD44^{hi}$ se manifeste légèrement chez les jeunes souris $CD47^{-/-}$ puis augmente progressivement et significativement avec l'âge de ces souris. Ceci s'applique pour la rate, les ganglions périphériques et les ganglions mésentériques (observations non montrées). Toutefois, nous n'observons pas d'augmentation significative dans le thymus.

La figure 7 comporte l'analyse de FACS montrant un déséquilibre dans la distribution/proportion des $CD4^+CD25^+$ activées et au repos parmi les $CD4^+$ chez les souris $CD47^{-/-}$ de 36 semaines comparativement aux souris de type sauvage du même âge. Dans la figure 8 les pourcentages des $CD4^+CD25^+CD44^{hi}$ par rapport aux $CD4^+CD25^+$ totaux sont calculés et l'accumulation de cette sous-population chez les

souris CD47^{-/-} dans la rate et les ganglions périphériques en fonction de l'âge est montrée.

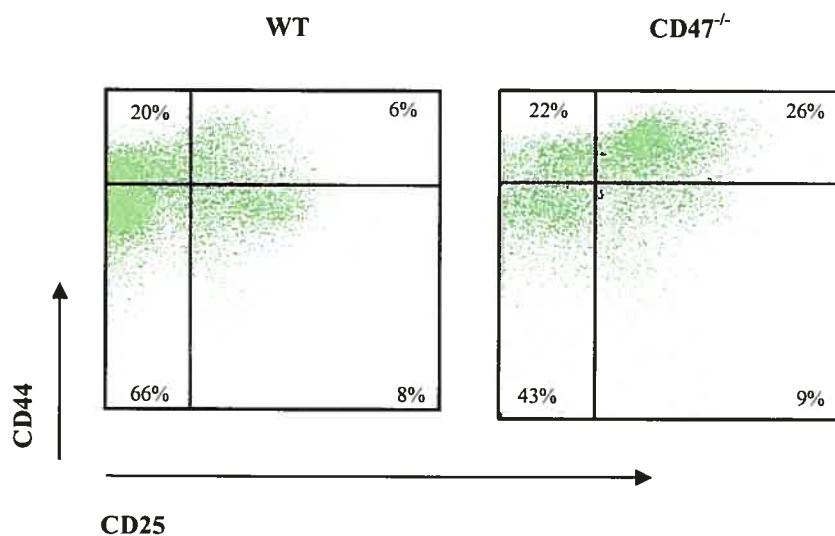


Figure 7. Distribution des sous-populations de Lc CD25⁺CD4⁺ en fonction de l'expression du CD44 chez les vieilles souris CD47^{-/-}.

Le pourcentage des cellules CD44^{hi} parmi les CD4⁺CD25⁺ est augmenté chez les vieilles souris CD47^{-/-}. Représentation biparamétrique de FACS des sous-populations de Lc CD4⁺ de la rate de souris WT et CD47^{-/-} âgées de 36 semaines analysée sur une fenêtre combinant ensemble R1 (cellules viables) et R2 (CD4⁺).

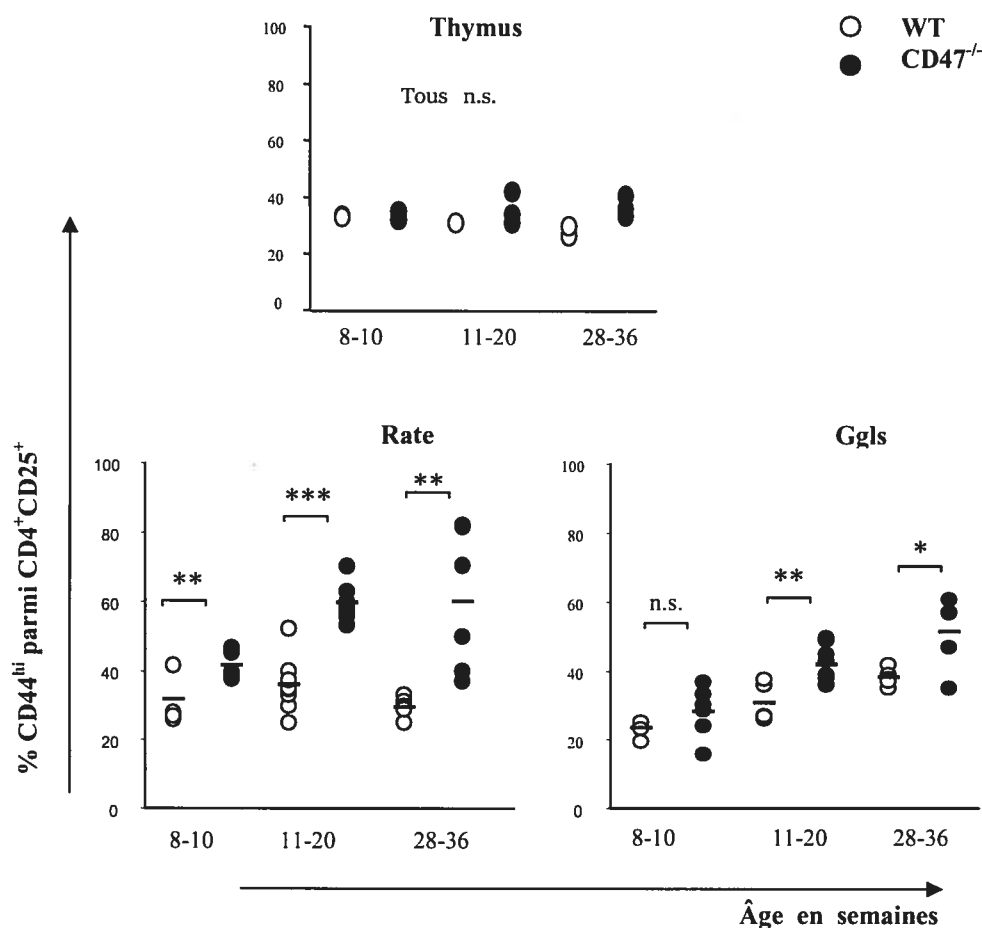


Figure 8. Les pourcentages des CD4⁺CD25⁺CD44^{hi} dans le thymus, la rate et les ganglions périphériques des souris CD47^{-/-} en fonction de l'âge.

Les pourcentages des cellules CD4⁺CD25⁺CD44^{hi} parmi les CD4⁺CD25⁺ totaux dans le thymus, la rate et les ganglions périphériques sont montrés en fonction de l'âge des souris WT et CD47^{-/-}. L'augmentation n'est pas observable dans le thymus de vieilles souris CD47^{-/-}. Les moyennes sont représentées par les barres horizontales. n = 5 à 11 souris par groupe. (stats: * p = 0.05-0.01 ; ** p < 0.01 ; *** p < 0.001)

Dans le but de mieux caractériser le phénotype des cellules $CD4^+CD25^+CD44^{hi}$ chez les souris $CD47^{-/-}$, nous avons réalisé des marquages de quatre couleurs avec différentes combinaisons de marqueurs de surface impliqués dans l'activation et l'identification des populations lymphocytaires. Les analyses sont faites sur la fenêtre combinant les cellules viables (R1) et les $CD4^+$ (R2). Les cellules sont ensuite divisées en quatre sous-populations en fonction de l'expression du CD25 et du CD44 (tel que montré dans la figure 7). Une dernière étape consiste à analyser les niveaux d'expression des différents marqueurs tels que : CD62L, CD69, ICOS, CD103 ($\alpha_E\beta_7$ integrin), CD127 (IL-7R) et CCR7 dans chacune des quatre sous-populations. Les souris incluses dans l'étude phénotypique sont âgées entre 10 et 18 semaines. Dans les tableaux III et IV sont représentées les moyennes d'intensité de fluorescence (Mean Fluorescence Intensity MFI) \pm la déviation standard de 3 à 8 souris des différents marqueurs analysés dans la rate et les ganglions périphériques respectivement. Des représentations d'histogramme de FACS pour CCR7, CD103 et CD127 dans les ganglions périphériques sont montrées dans la figure 9.

Les résultats démontrent que les cellules $CD4^+CD25^+CD44^{hi}$ dans la rate et les ganglions périphériques chez les souris $CD47^{-/-}$ expriment le phénotype d'activation conventionnel des Lc T ($CD44^{hi}$, $CD62L^{lo}$ et $CD69^+$) et ce de façon comparable aux cellules correspondantes Balb/C (tableaux III et IV). L'expression de ces marqueurs sur les autres sous-populations de $CD4^+$ des souris $CD47^{-/-}$ ne présentent pas de différences significatives avec les Balb/C.

Les $CD4^+CD25^+CD44^{hi}$ expriment le CD127 (le récepteur à l'IL-7) dont l'expression identifie les cellules activées destinées à devenir des cellules mémoires (Wojciechowski, 2006). L'expression du CD127 à la surface des $CD25^+CD44^{hi}$ KO est cependant inférieure à son expression sur les $CD25^+CD44^{hi}$ WT; ce qui diminue la possibilité que ces cellules soient des cellules mémoires et favorise leur appartenance aux Treg (Liu, 2006; Seddiki, 2006) (figure 9).

L'expression du CCR7 (Chemokine Receptor 7) à la surface des cellules $CD25^+CD44^{hi}$ est, à son tour, comparable entre WT et $CD47^{-/-}$. Ce récepteur de chimiokine est plutôt associé aux Lc T naïfs et une sous-population de cellules mémoires restantes « Central memory T (T_{CM}) »; l'expression du CCR7 à la surface des Lc est associé à l'acquisition d'un phénotype migrateur vers les organes lymphoïdes secondaires. Une fois activées, les cellules effectrices et les cellules mémoires effectrices « T_{EM} » perdent l'expression du CCR7 (Campbell, 2001). Récemment, plusieurs publications ont démontrés que la sous-population naïve de Treg $CD62L^{hi}$ exprime des niveaux élevés de CCR7 (Ermann, 2006; Fu, 2004; Siegmund, 2005; Szanya, 2002). Nos résultats sur les Treg naïves sont en concordance avec ceci, toutefois nous n'observons pas de différence entre WT et $CD47^{-/-}$ (figure 9).

D'autre part, nous démontrons que les $CD4^+CD25^+CD44^{hi}$ expriment des niveaux élevés du co-stimulateur inductible ICOS (the inducible costimulator) (tableau IV), dont l'expression est normalement augmentée (up-regulated) sur les lymphocytes T suite à leur activation. Contrairement au CD28, qui induit la sécrétion de l'IL-2, ICOS possède une préférence à induire l'IL-10 par les cellules activées (Lohning, 2003). ICOS est aussi exprimé par une population particulière de Lc T suppresseurs décrite chez l'humain (Vermeiren, 2004) et une autre nommée « Th1-like Treg » chez les souris (Stock, 2004). Les niveaux d'expression du ICOS sont comparables entre WT et $CD47^{-/-}$ à l'exception d'une augmentation sur les Treg activées dans les ganglions périphériques.

Les résultats de l'analyse phénotypique démontrent cependant, une expression élevée et significative du CD103 sur les cellules $CD4^+CD25^+CD44^{hi}$ $CD47^{-/-}$ par rapport à leurs contrôles de type sauvage dans la rate et les ganglions périphériques; CD103 (aussi nommé, αIEL , $\alpha M290$, OX62 ou $\alpha E\beta 7$ integrin) est une integrine exprimée par 40-50% des Lc T $CD4^+$ de la muqueuse intestinale, aussi exprimée par les Lc du tractus urogénital et par les Lc dérivés des poumons. Cette molécule interagit avec la

molécule E-cadherin et induit l'adhérence des Lc T aux cellules épithéliales. *In vitro*, l'induction de CD103 sur les Lc T est assurée par le TGF β (Agace, 2000).

Des études récentes ont démontré que le CD103 est exprimé par 30% des Lc T régulateurs CD4⁺CD25⁺ (McHugh, 2002), qu'une population de Lc CD4⁺ suppresseur est identifiée par l'expression de CD103 et contient des cellules CD25⁺ et CD25⁻, et que cette molécule est responsable de la rétention des Lc T régulateurs aux sites d'inflammation pendant une infection avec *Leishmania major* (Agace, 2000; Suffia, 2005)

Finalement, nous remarquons chez les souris CD47^{-/-}, une augmentation du niveau d'expression du CD103 sur les cellules CD4⁺CD25⁺CD44^{lo} dans les ganglions périphériques, et des niveaux de ICOS sur les cellules mémoires CD4⁺CD25⁻CD44^{hi} dans la rate et les ganglions périphériques.

MFI \pm SD	CD44		CD62L		CD69		ICOS (CD278)		CD103	
	WT	KO	WT	KO	WT	KO	WT	KO	WT	KO
Naïves CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD44 ^{Lo}	174 \pm 45	177 \pm 55	76 \pm 17	70 \pm 22	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Mémoires CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD44 ^{Hi}	934 \pm 215	982 \pm 268	22 \pm 7	18 \pm 4	neg	neg	28 \pm 1	40 \pm 2	5 \pm 3	11 \pm 2
Treg naïves CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD44 ^{Lo}	256 \pm 43	260 \pm 52	62 \pm 11	54 \pm 13	neg	neg	22 \pm 6	37 \pm 11	25 \pm 13	28 \pm 12
Treg activées CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD44 ^{Hi}	1227 \pm 265	1251 \pm 261	32 \pm 6	32 \pm 6	22 \pm 2	16 \pm 1	75 \pm 8	78 \pm 2	68 \pm 34	114 \pm 35

Tableau III. Phénotype des Lc CD4⁺ de la rate des souris CD47^{-/-}.

Caractérisation phénotypique des 4 sous populations de lymphocytes CD4⁺ de la rate. Les cellules sont analysées dans la fenêtre des cellules viables et des CD4⁺ puis divisées en sous-populations selon l'expression du CD25 et les niveaux de CD44. Les valeurs indiquent les moyennes MFI \pm déviation standard de n = 3 à 8 souris pour chacun des marqueurs. Souris âgées entre 10 et 18 semaines.

MFI \pm SD	CD44		CD62L		CD69		ICOS (CD278)		CD103	
	WT	KO	WT	KO	WT	KO	WT	KO	WT	KO
Naïves CD4 ⁺ CD25 ⁻ CD44 ^{Lo}	207 \pm 96	160 \pm 58	76 \pm 16	75 \pm 2	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Mémoires CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD44 ^{Hi}	1146 \pm 425	1203 \pm 468	42 \pm 9	38 \pm 8	15 \pm 2	11 \pm 1	72 \pm 14	124 \pm 0	10 \pm 3	12 \pm 4
Treg naïves CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD44 ^{Lo}	263 \pm 62	265 \pm 82	68 \pm 5	64 \pm 9	neg	neg	neg	neg	46 \pm 10	54 \pm 11
Treg activées CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD44 ^{Hi}	1475 \pm 235	1586 \pm 425	24 \pm 3	23 \pm 3	29 \pm 1	20 \pm 2	170 \pm 27	235 \pm 39	109 \pm 22	158 \pm 24

Tableau IV. Phénotype des Lc CD4⁺ des ganglions périphériques des souris CD47^{-/-}.

Caractérisation phénotypique des 4 sous populations de lymphocytes CD4⁺ des ganglions périphériques. Les cellules sont analysées dans la fenêtre des cellules viables et des CD4⁺ puis divisées en sous-populations selon l'expression du CD25 et les niveaux de CD44. Les résultats indiquent les moyennes d'expression MFI \pm déviation standard de n = 3 à 8 souris pour chacun des marqueurs. Souris âgées entre 10 et 18 semaines.

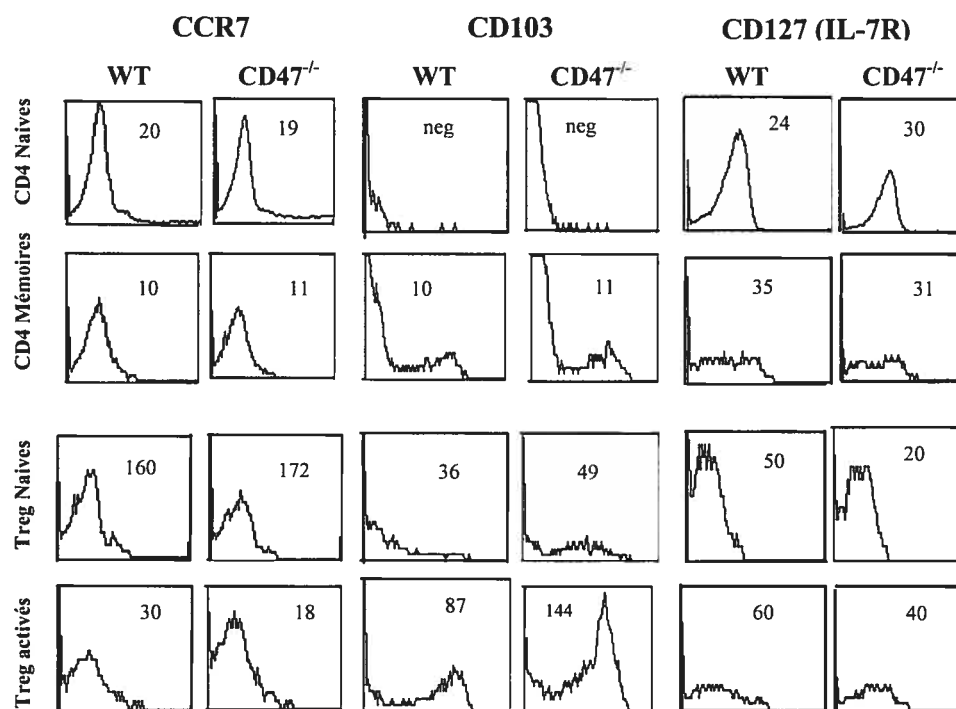


Figure 9. Expression de CCR7, CD103 et CD127 sur les sous-populations de Lc CD4⁺ chez les souris CD47^{-/-}.

Représentations d'histogramme de FACS des niveaux d'expression (MFI) du CCR7, CD103 et CD127 analysés sur les quatre sous-populations de CD4⁺ des ganglions périphériques de souris WT et CD47^{-/-} âgées de 18 semaines. Les analyses sont obtenues sur des fenêtres combinant chacune des sous-populations à celle des cellules viables et des CD4⁺. Représentatives de n = 3 à 8 souris par marqueur.

III.4. Étude de l'expression de Foxp3 dans les $CD4^+CD25^+$ de souris $CD47^{-/-}$

Les analyses effectuées jusqu'ici dans notre étude démontrent l'augmentation d'une sous-population de $CD4^+CD25^+$, à savoir les $CD4^+CD25^+CD44^{hi}$, chez les souris $CD47^{-/-}$. Cependant, ces cellules peuvent aussi bien correspondre à des cellules effectrices activées, à des cellules mémoires activées (T_{EM}) ou à des Treg activées. Des marquages intra-cytoplasmiques pour Foxp3 «le gène maître des Lc T régulateurs naturels» sont effectués sur des cellules de la rate et des ganglions périphériques afin de déterminer la nature de cette population cellulaire augmentée chez les souris $CD47^{-/-}$. Ceci est réalisé par des quadruples marquages avec CD4, CD25 et CD44 en surface suivis par le marquage Foxp3 en intra-cytoplasmique chez des souris de différents groupes d'âge. De la même manière que les marquages précédents, les analyses sont faites sur la fenêtre des cellules viables et $CD4^+$ et le pourcentage de cellules exprimant Foxp3 est déterminé en fonction du CD25 et du CD44. Les résultats démontrent une augmentation de cellules $CD25^+Foxp3^+$ parmi les $CD4^+$ dans la rate et les ganglions périphériques de souris $CD47^{-/-}$ et l'augmentation accentuée avec l'âge est confirmée.

Dans la figure 10a nous montrons une analyse de FACS de cellules de ganglions périphériques de souris âgées de 18 semaines. Ceci est représentatif d'au moins dix marquages par génotype sur des cellules de rate ou de ganglions périphériques de souris âgées entre 18 et 30 semaines. Dans la figure 10b, nous montrons l'analyse de la moyenne du pourcentage des cellules Foxp3 positives parmi les cellules $CD4^+CD25^+CD44^{hi}$ et $CD4^+CD25^+CD44^{lo}$ de la rate et des ganglions périphériques; la majorité de ces cellules (plus que 95%) sont Foxp3⁺. Par ceci, nous confirmons que la hausse de $CD4^+CD25^+CD44^{hi}$ observée chez les souris $CD47^{-/-}$ âgées correspond à une augmentation véritable de Lc T régulateurs activés.

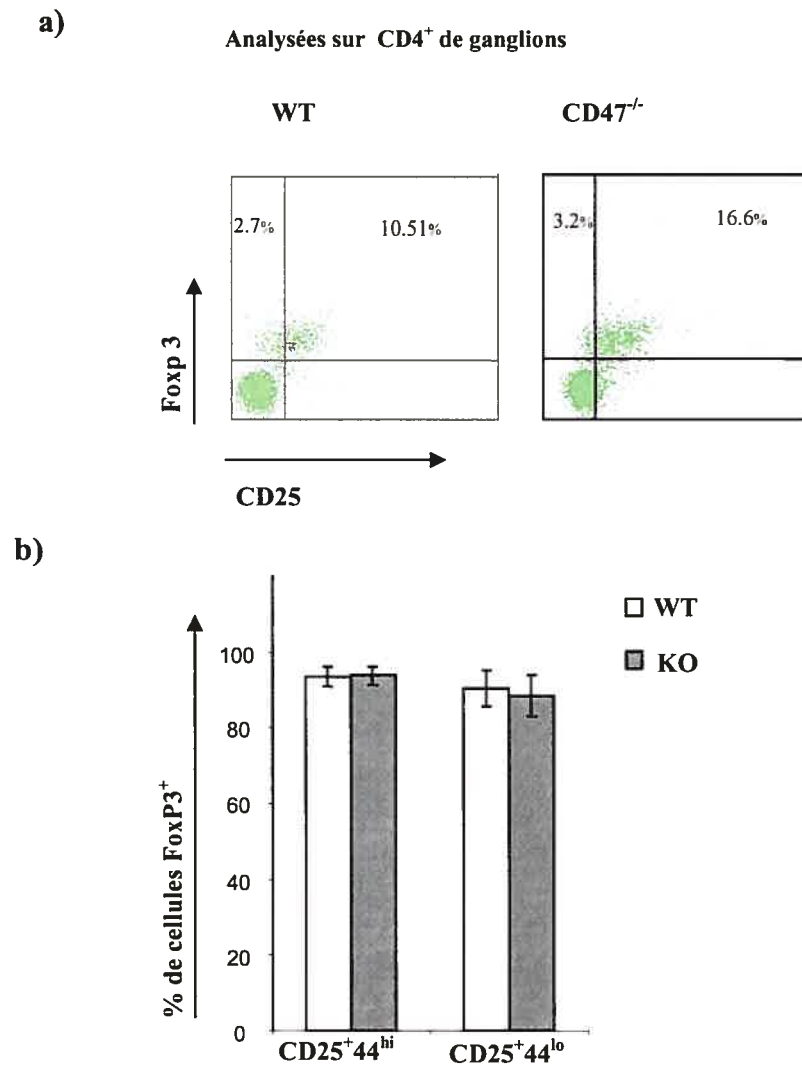


Figure 10. L'expression de Foxp3 dans les cellules $CD4^+CD25^+$ chez les vieilles souris $CD47^{-/-}$.

a) Représentation « Dot plot » de FACS de cellules de ganglions de souris âgées de 18 semaines montrant les proportions de cellules $CD25^+Foxp3^+$ dans la fenêtre combinant cellules viables et $CD4^+$.

b) Les moyennes \pm SD de $n=10$ du pourcentage des cellules $Foxp3^+$ parmi les deux sous population de Treg. Les marquages sont effectués sur des cellules de rates et de ganglions périphériques de souris âgées de 18 à 36 semaines. Les analyses sont réalisées dans une fenêtre combinant cellules viables et $CD4^+$.

III.5. Évaluation *in vitro* de la fonction suppressive des Treg de souris CD47^{-/-}

Pour évaluer le rôle du CD47 sur la fonction suppressive des Treg *in vitro*, des tests de coculture sont réalisés avec des cellules purifiées de souris CD47^{-/-} ou de souris WT; une première série de coculture avec des cellules de souris jeunes (8-10 semaines), une autre avec des cellules de souris plus âgées (16-19 semaines) sont réalisées.

La fonction suppressive des Treg CD47^{-/-} est mesurée par l'inhibition de la prolifération des cellules effectrices WT. De plus, la susceptibilité des cellules effectrices CD47^{-/-} à la suppression par les Treg est mise en question et des cocultures hétérologues sont effectuées dans le but d'y répondre. Les niveaux de pureté des Treg de souris CD47^{-/-} étaient similaires à ceux des Treg de souris WT dans toutes nos expériences (paired student Ttest $p > 0.05$). Il en est de même pour la pureté des cellules effectrices CD4⁺CD25⁻.

Pour comparer la fonction suppressive des Treg CD47^{-/-} avec celle des Treg Balb/C, le pourcentage de suppression est calculé. Ce pourcentage est obtenu en considérant le niveau de prolifération des cellules effectrices seules comme le 100% de prolifération. Les résultats présentés dans la figure 11 regroupent les pourcentages de suppression des Treg de jeunes et plus vieilles souris dans des cocultures autologues et hétérologues avec un ratio Treg/Teff de 1:1, démontrant une faible baisse dans la fonction suppressive des Treg CD47^{-/-} chez les jeunes souris qui paraît plus accentuée chez les souris CD47^{-/-} plus âgées par rapport au niveau de suppression par les Treg WT du même âge.

Dans les essais de cocultures autologues, les cellules cibles CD4⁺CD25⁻CD47^{-/-} sont inhibées par les CD4⁺CD25⁺CD47^{-/-} à des niveaux inférieurs à l'inhibition des cibles CD4⁺CD25⁻ Balb/C par les CD4⁺CD25⁺ Balb/C; d'autre part les résultats de cocultures hétérologues démontrent que les cellules cibles CD4⁺CD25⁻CD47^{-/-} sont supprimée de façon très efficace par les CD4⁺CD25⁺ Balb/C, alors que les cibles Balb/C sont moins bien supprimées par les CD4⁺CD25⁺CD47^{-/-}. Suite à ceci, la

possibilité que les cellules cibles $CD4^+CD25^-CD47^{-/-}$ soient plus résistantes à l'inhibition est écartée et le défaut est donc attribué à la fonction des Treg $CD47^{-/-}$.

Chez les souris $CD47^{-/-}$ âgées (entre 16 et 19 semaines), les résultats démontrent que les $CD4^+CD25^+CD47^{-/-}$ inhibent encore moins bien la prolifération des cellules cibles quelque soit le génotype auquel appartiennent ces dernières. Toutefois, les statistiques effectués sur la totalité de nos cocultures ne montrent pas de différence significative entre WT et $CD47^{-/-}$ et ceci pourrait résulter du faible nombre de cocultures réalisées avec des cellules de vieilles souris.

Une titration représentative de coculture de Balb/C et de $CD47^{-/-}$ de jeunes souris (8 semaines) est montrée dans la figure 12; le profil d'inhibition est comparable entre Balb/C et $CD47^{-/-}$; l'inhibition reste efficace jusqu'à des ratios de 1:4 Treg/Teff dans les deux cas avec une tendance de baisse de la suppression chez les jeunes souris $CD47^{-/-}$. Une différence dans la cinétique de suppression entre cellules $CD4^+CD25^+$ Balb/C et $CD47^{-/-}$ est toutefois possible.

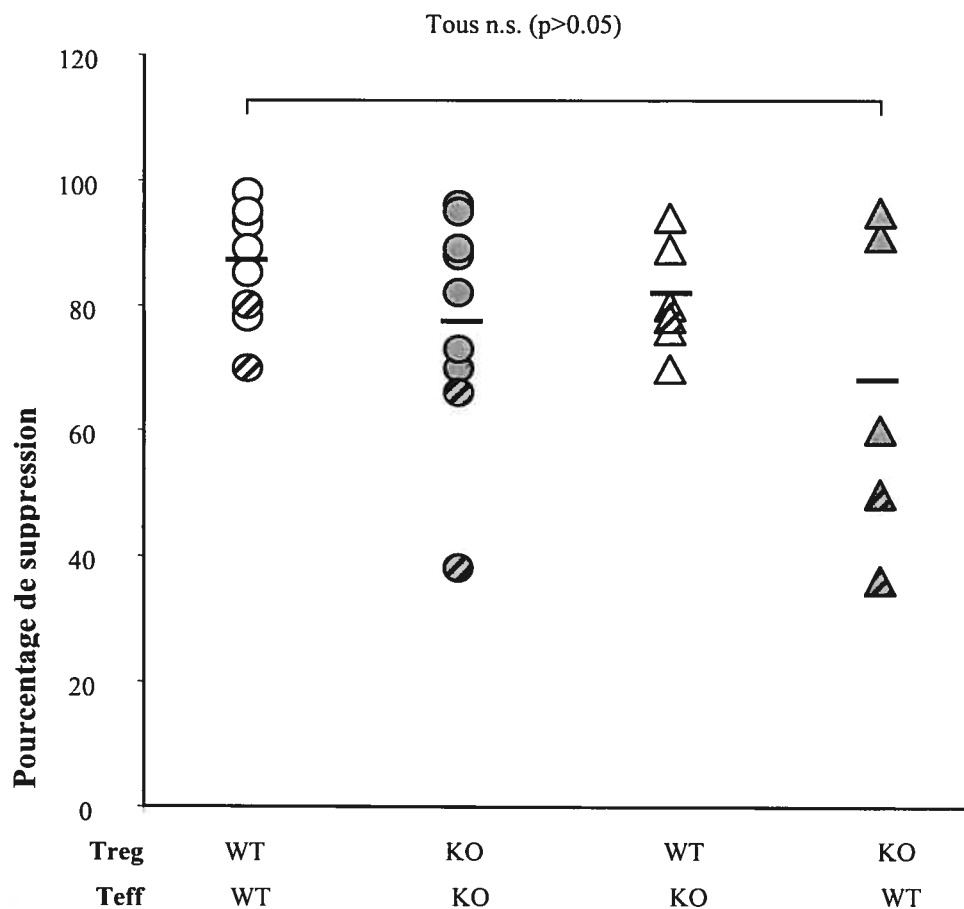


Figure 11. La fonction suppressive *in vitro* des Treg de souris $CD47^{-/-}$.

La fonction suppressive *in vitro* des Treg $CD47^{-/-}$ est surtout diminuée chez les vieilles souris. Les résultats représentent les pourcentages de suppression de cocultures autologues ($n = 10$) ou hétérologues ($n = 5$) à un ratio Treg/Teft de 1:1. Les symboles rayés représentent les expériences réalisées avec des souris âgées de 16 semaines et plus. (stats analysés par Anova test)

○ TregWT/Teft WT; ● TregKO/TeftKO;

△ TregWT/TeftKO; ▲ TregKO/TeftWT;

◐ TregWT/Teft WT de vieilles souris, ◑ TregKO/TeftKO de vieilles souris,

◒ TregWT/TeftKO de vieilles souris, ◓ TregKO/TeftWT de vieilles souris.

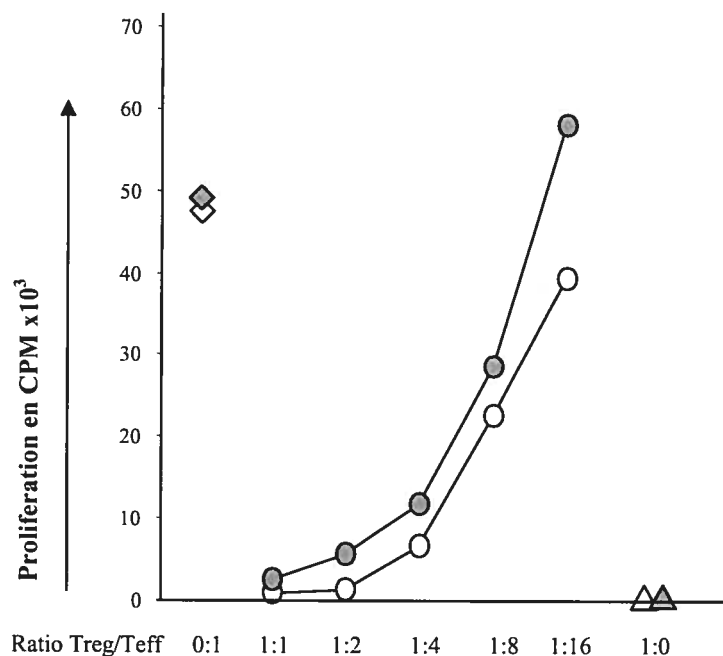


Figure 12. Titration *in vitro* de la suppression des Treg de jeunes souris CD47^{-/-}.

Une représentative de titration de coculture WT et CD47^{-/-} de souris âgées de 8 semaines; Les résultats sont exprimés par le taux de prolifération en CPM après une culture de 72 heures avec une incorporation de la [3H] Thymidine radioactive pendant les 6 dernières heures. Un profil de suppression similaire entre jeune WT et CD47^{-/-} avec une tendance vers une suppression moins efficace du côté des KO.

- ◇ contrôle Teff WT seul;
- ◆ contrôle Teff KO seul;
- △ contrôle Treg WT seul;
- ▲ contrôle Treg KO seul;
- titration Treg WT/ Teff WT ;
- titration Treg KO / Teff KO;

III.6. Évaluation *in vitro* du rôle de CD47 sur la fonction des cellules effectrices CD4⁺CD25⁻

Parallèlement à la fonction des Treg, nous avons analysé la fonction des Lc T CD4⁺ effecteurs chez les souris CD47^{-/-}. Des stimulations cellulaires de CD4⁺ et de CD4⁺CD25⁻ purifiés de la rate sont réalisées avec l'anti-CD3 soluble en présence de Lc B WT mitomycinés comme APC. Les réponses sont évaluées par la mesure de cytokines secrétées dans les surnageants de culture. Les puretés des CD4⁺ ainsi que celle des CD4⁺CD25⁻ étaient similaires entre WT et CD47^{-/-} dans toutes nos expériences (paired Ttest $p > 0.05$ avec des puretés dépassant 90% dans la majorité des expériences).

Les cytokines secrétées suite à ces stimulations sont dosées par ELISA dans les surnageants de culture récupérés à différents points de cinétique : la sécrétion d'IL-2 est mesurée après 24 heures, celles d'IFN γ et d'IL-10 après 72 heures. L'IL-2 est dosée tôt durant la stimulation puisque cette cytokine peut éventuellement être consommée par les cellules en culture, au contraire de l'IFN γ et de l'IL-10 qui s'accumulent dans le milieu. La figure 13 montre une expérience représentative de six souris, pour chaque génotype, dont l'âge varie entre 8 et 14 semaines. Nos résultats démontrent que les cellules purifiées de souris CD47^{-/-} (les CD4⁺ totaux et les CD4⁺CD25⁻ effecteurs) secrètent des niveaux plus élevés des trois cytokines dosées. L'effet de la déplétion des Treg *in vitro* est observable chez les deux types de souris par une augmentation des niveaux de sécrétion de cytokines chez les effecteurs CD4⁺CD25⁻ en comparaison avec les CD4⁺ totaux non fractionnés.

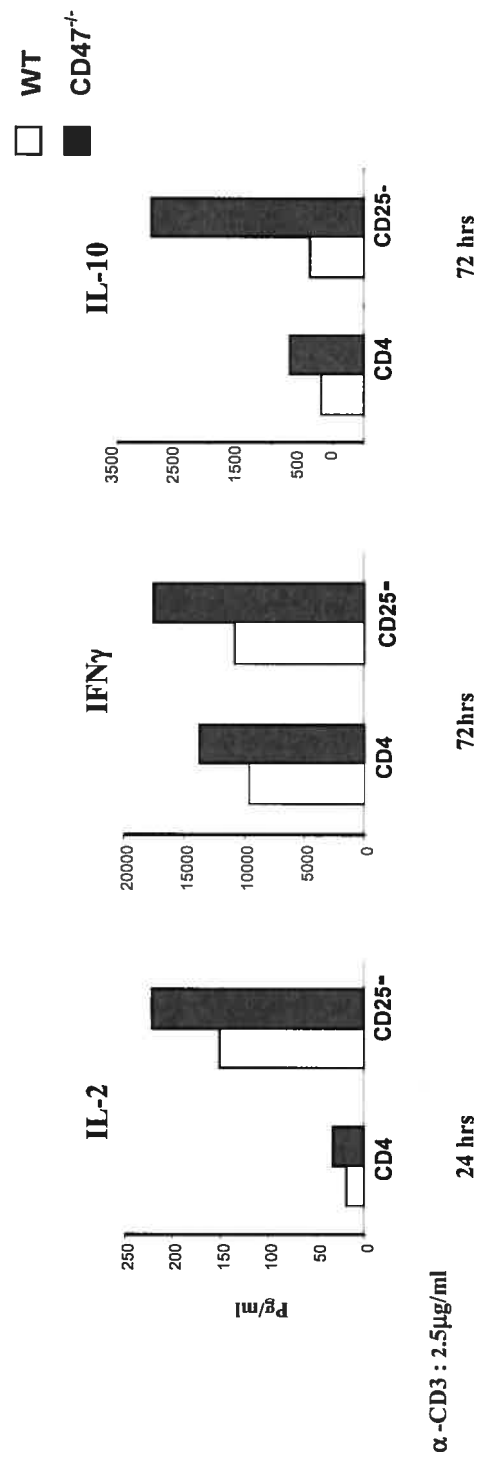


Figure 13. La sécrétion de cytokines *in vitro* par les Lc CD4⁺ ainsi que les CD4⁺CD25⁻ effecteurs chez les CD47^{-/-}.

Une hypersécrétion de cytokines par les cellules CD47^{-/-} est observée suite à une activation *in vitro*. L'IL-2 est dosée dans le surnageant de 24 heures, l'IFNγ et l'IL-10 sont dosées dans les surnageants de 72 heures. Cytokines dosées par ELISA (Souris âgées de 8 à 14 semaines). Expérience représentative de six activations cellulaires séparées ($p < 0.01$).

III.7. Évaluation *in vivo* du rôle du CD47 sur la fonction des Treg et des Lc T CD4⁺ effecteurs

Dans le but d'étudier *in vivo* la fonction suppressive des Treg et des Lc T effecteurs chez les souris CD47^{-/-}, nous avons choisi d'éliminer (ou d'inactiver) les Treg avant l'immunisation avec l'antigène ovalbumine (OVA) et d'étudier la réponse secondaire des Lc T CD4⁺ *in vitro* (prolifération et sécrétion d'IFN γ en réponse à l'OVA). Puisqu'une augmentation de la population activée de Treg est plus précisément observée chez les vieilles souris CD47^{-/-}, nous avons réalisé l'étude de la fonction suppressive *in vivo* chez des souris âgées entre 16 et 30 semaines. Une simple injection de l'anti-CD25 pure (PC61) se traduit après trois jours par une inactivation des Treg (perte de la fonction suppressive pouvant durer entre 13 et 15 jours) (Kohm, 2006; Pasare, 2004). Les souris sont par la suite immunisées dans leurs paumes de pattes (sous cutanée) avec de l'OVA et du LPS dans l'adjuvant incomplet de Freund puis sacrifiées au jour 11 après l'inactivation (donc avant que les Treg ne récupèrent leur fonction suppressive).

Les ganglions poplités drainant sont prélevés et les cellules totales sont marquées au CFSE puis restimulées *in vitro* avec 500 μ g/ml d'OVA. Après 72 heures de restimulation les cellules sont récupérées, marquées avec l'anti-CD4 seul ou avec l'anti-IFN γ intra-cytoplasmique, pour analyser les paramètres d'intérêt au sein des Lc T CD4⁺ en particulier. Les résultats sont analysés sur des groupes de cinq souris non injectées au PC61 et de sept souris injectées de cet anticorps inactivant pour chaque génotype (WT et CD47^{-/-}). Des souris non déplétées et immunisées WT et CD47^{-/-} sont utilisées comme souris témoins. Des Lc non stimulés à l'antigène servent de cultures de référence. La prolifération (CFSE) ainsi que la sécrétion d'IFN γ par les contrôles (WT ou CD47^{-/-}) non stimulés à l'antigène sont négatives.

Les pourcentages des Lc CD4⁺ divisés, après 72 heures de stimulation secondaire à l'OVA, sont montrés dans la figure 14; les pourcentages des cellules CD4⁺IFN γ ⁺ analysés après 72 heures de stimulation secondaire à l'OVA sont montrés dans la

figure 15. Les pourcentages sont obtenus directement à partir de nos analyses de FACS, dans lesquelles nous avons considéré comme cellules divisées toutes les cellules qui ont perdues le niveau de CFSE par rapport aux cellules CFSE^{hi} du même échantillon. Les résultats indiquent une augmentation de la prolifération des CD4⁺ qui étaient sensibilisées en absence de Treg fonctionnels (souris déplétées) par rapport aux CD4⁺ de souris non déplétées et ceci du côté des WT mais pas de celui des CD47^{-/-}. Parallèlement, le pourcentage des cellules CD4⁺ productrices d'IFN γ était aussi augmenté chez les souris WT déplétées par rapport aux souris WT non déplétées. L'effet n'est toutefois pas observable chez les souris CD47^{-/-} déplétées. Le fait que ni la prolifération des CD4⁺CD47^{-/-}, ni leur production d'IFN γ ont été facilitées par la déplétion suggère fortement que les Treg de souris CD47^{-/-} sont peu efficaces *in vivo*.

En accord avec nos résultats de la fonction des cellules effectrices *in vitro* (figure 13), les résultats de stimulation secondaire démontrent que les CD4⁺ de souris CD47^{-/-} non déplétées produisent des niveaux plus élevés d'IFN γ que leurs contrôles de type WT (figure 15). Cependant, cette hypersécrétion n'est pas observable en réponse secondaire dans le cas de CD4⁺ de souris CD47^{-/-} qui ont subi la déplétion des Treg *in vivo* (figure 15). Cette dernière observation contredit l'hypersécrétion de cytokines par les CD4⁺CD25⁻ observée *in vitro*. Plusieurs facteurs, en plus du traitement au PC61, peuvent être responsables de cette apparente contradiction, citons certaines différences dans le système expérimental suivi pour chacun des cas. Dans les expériences de stimulation *in vitro*, il s'agit d'une stimulation primaire de cellules T hautement purifiées, activées de manière polyclonale en présence de cellules B mitomycinées comme APC. Alors que dans les expériences *in vivo*, c'est une stimulation secondaire de cellules totales de ganglions avec un antigène spécifique en présence des APC naturelles du ganglion.

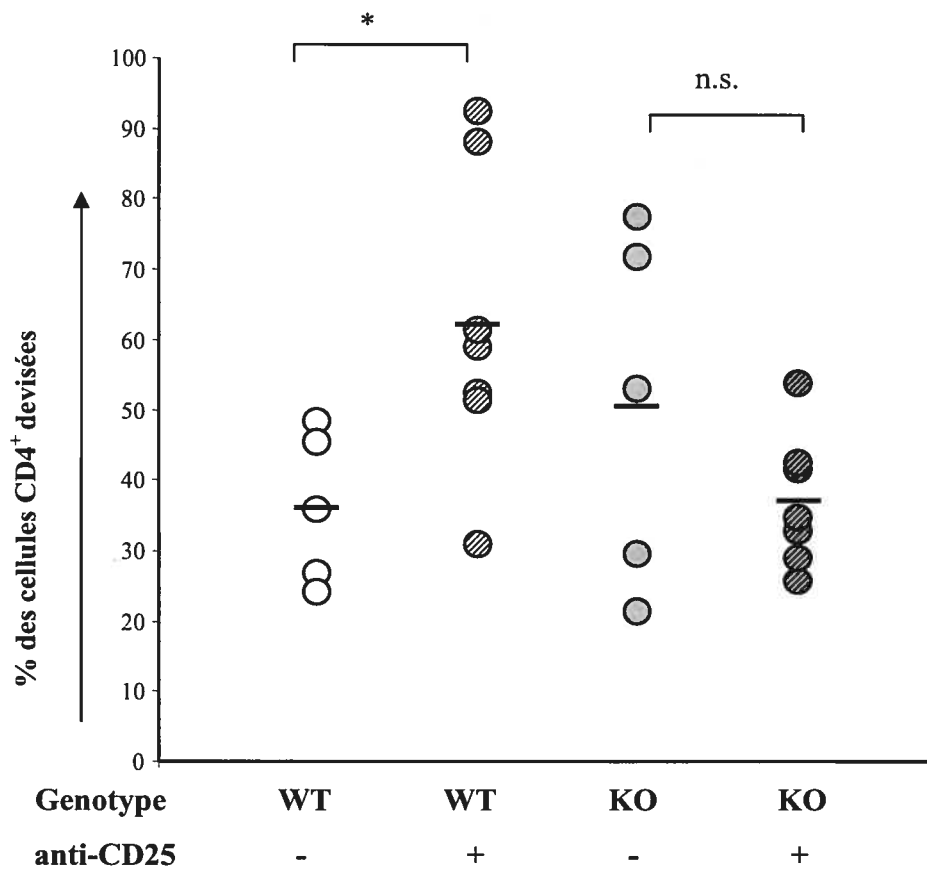


Figure 14. La prolifération des CD4 en réponse secondaire après déplétion des Treg CD47^{-/-} *in vivo*.

Les pourcentages des Lc CD4⁺ divisées après 72 heures de stimulation secondaire (0.5 mg/ml OVA). Les résultats sont interprétés en fonction de la diminution des niveaux du CFSE lors des divisions cellulaires. Les symboles non-rayés représentent les souris non déplétées puis immunisées (n=5), les symboles rayés représentent les souris déplétées puis immunisées (n=7). Une augmentation de la prolifération est uniquement observée chez les souris WT déplétées par rapport aux contrôles respectifs non déplétées (stats : * p = 0.05-0.01).

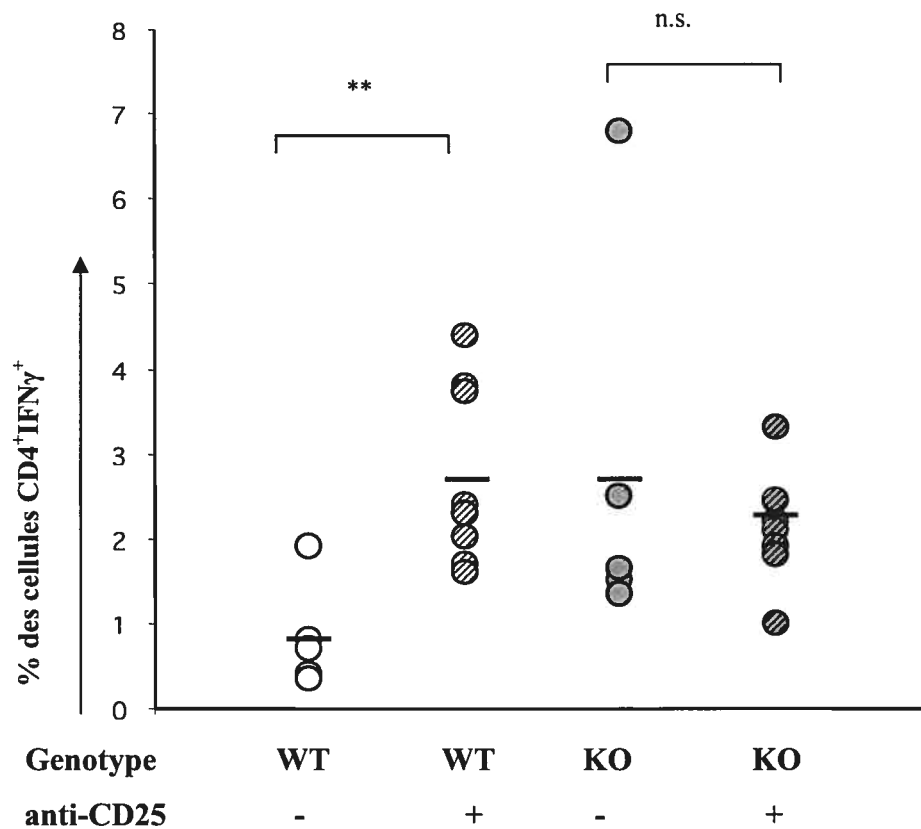


Figure 15. La synthèse d'IFN γ en réponse secondaire après déplétion des Treg CD47^{-/-} *in vivo*.

Les pourcentages des Lc CD4⁺ sécrétant l'IFN γ après 72 heures de stimulation secondaire (0.5 mg/ml OVA). Résultats analysés sur les cellules marquées pour CD4 en surface et pour IFN γ intra-cytoplasmique. Les symboles non-rayés représentent les souris non déplétées puis immunisées (n=5), les symboles rayés représentent les souris déplétées puis immunisées (n=7). Une augmentation du pourcentage des CD4⁺IFN γ ⁺ est observée uniquement chez les souris WT déplétées par rapport aux contrôles respectifs non déplétées (stats : ** p < 0.01).

Section IV

Discussion des résultats

Notre objectif premier est l'identification du rôle du CD47 dans la régulation des réponses immunitaires.

Un intérêt plus précis est porté sur le rôle du CD47 dans le développement et la fonction des lymphocytes T régulateurs naturels $CD4^+CD25^+$ chez la souris. Du fait que le CD47 est exprimé sur toutes les cellules de l'organisme, les effets observés sur les lymphocytes T régulateurs $CD47^{-/-}$ pourraient résulter directement de l'absence du CD47 sur ces cellules ou aussi être la conséquence de l'absence de cette molécule sur d'autres entités cellulaires ou moléculaires influençant l'homéostasie et la fonction des T régulateurs.

Une façon directe qui facilite les études des rôles de certaines molécules sur les populations cellulaires est le développement de souris avec une délétion génique d'un type cellulaire spécifique « Tissue specific gene targeting », dans notre cas des souris privées uniquement de l'expression du CD47 de la surface de leur Lc T. Cependant, ce modèle ne peut être réalisé dans le cas de la molécule CD47, puisque cette molécule est considérée un antigène de soi et les cellules qui ne l'expriment pas sont rapidement phagocytées et éliminées de la circulation. La stimulation du CD47 par SIRP α est connu pour son effet inhibiteur de la phagocytose induite par les IgG ou le complément. En effet, la liaison du CD47 avec le domaine extracellulaire du SIRP α sur les cellules phagocytaires induit une phosphorylation des tyrosines de ce dernier impliquant l'activation des phosphatases inhibitrices tel que SHP-1. Une fois activées, ces phosphatases inhibitrices empêchent la phagocytose des cellules exprimant le CD47 (Kharitononkov, 1997; Gardai, 2005; Gardai, 2006; Oldenborg, 2000; Olsson, 2006).

IV.1. Rôle du CD47 dans le développement des Treg

Le CD47 contrôle négativement la taille de la population périphérique des Lc T régulateurs activés.

Les mécanismes contrôlant l'homéostasie des Lc T ne sont pas bien connus. Cette homéostasie est définie par le maintien d'un certain équilibre, non seulement quantitatif mais aussi qualitatif, de la distribution des lymphocytes T en périphérie. La survie, le renouvellement, l'expansion et la mort des lymphocytes dépendent des signalisations cellulaires et de certaines cytokines. Un rôle clé dans le contrôle de cette homéostasie est attribué aux cytokines de la famille γc tels l'IL-15 et l'IL-7 et aux interactions des molécules du CMH avec les peptides du soi. L'IL-7 est particulièrement importante et des niveaux basales de cette cytokine contrôlent la taille du pool des Lc T (Surh, 2005).

Récemment, les lymphocytes T régulateurs $CD4^+CD25^+$ ont été aussi identifiés comme un facteur impliqué dans le contrôle de l'homéostasie des Lc, dès lors les souris $CD25^{-/-}$ développent une hyperplasie lymphoïde associée à l'accumulation non contrôlée de lymphocytes T et B activés aboutissant au développement de maladies auto-immunes (Almeida, 2005).

À leur tour, les Treg représentent un pourcentage stable de 5 à 15% de la population des Lc $CD4^+$ chez l'homme sain et la souris non manipulée. Ceci démontre que l'homéostasie de ces cellules est assurée par un mécanisme strict et indépendant. Jusqu'à présent plusieurs cytokines et molécules de co-stimulation importantes dans l'homéostasie des Treg sont identifiées. Le nombre périphérique des cellules T $CD4^+CD25^+$ dépend de manière critique de l'IL-2 (Malek., 2002). Cette dépendance se traduit par la forte expression du CD25 (chaîne alpha du récepteur à l'IL-2) à la surface des Treg. Les déficiences en IL-2, en CD25 ou en leurs molécules de signalisation (downstream signaling molecules) incluant JAK-3 et STAT-5, induisent une forte réduction du nombre des cellules $CD4^+CD25^+$ et le développement de maladie lymphoproliférative et d'auto-immunité. Les interactions des molécules de co-stimulations, notamment celles entre CD86 et CD28 sont nécessaires pour le

développement thymique et le maintien périphérique des $CD4^+CD25^+$ (Lohr, 2003; Tang, 2003). Des molécules de la superfamille des “tumor necrosis factor” participent aussi au maintien des Treg. Les souris $CD40^{-/-}$ ainsi que $CD40L^{-/-}$ possèdent un nombre réduit de Lc T $CD4^+CD25^+$ (Kumanogoh, 2001).

Dans notre étude, nous démontrons que le CD47 est un autre candidat potentiellement impliqué dans le contrôle de l'homéostasie des Lc T régulateurs quantitativement (en préservant un nombre stable de Lc T régulateurs suffisant pour supprimer les Lc pathogéniques et pour permettre aux cellules naïves et mémoires de répondre adéquatement aux agressions) et qualitativement (en préservant la distribution des différentes sous-populations de Treg). Contrairement aux mécanismes de contrôle décrits ultérieurement, le CD47 assure un contrôle négatif du nombre des Treg. En effet, nos résultats démontrent que l'absence du CD47 engendre chez la souris une augmentation particulière des cellules $CD4^+CD25^+CD44^{hi}Foxp3^+$ en périphérie au cours du vieillissement.

L'hypothèse d'un processus de différenciation des T régulateurs naturels d'un phénotype plutôt naïve en phénotype de cellules mémoires ou activées durant le développement cellulaire est supporté par plusieurs observations dans la littérature: Chez l'homme, les Treg naïves $CD4^+CD25^{hi}CD45RA^+$ représentent la majorité des Treg du sang de cordon, alors que le sang adulte contient un plus grand nombre de Treg activés $CD4^+CD25^{hi}CD45RO^+$. Les Treg de jeunes souris n'expriment pas le CD103 ($\alpha_E\beta_7$ integrin) mais acquièrent cette molécule au cours du vieillissement (Dujardin, 2004). Parallèlement, deux récentes études ont rapporté, chez l'homme, une augmentation d'un facteur de 2.4 du nombre de Treg chez les personnes âgées de 65–90 ans comparativement aux jeunes adultes, ce qui peut expliquer en partie la prévalence des maladies immunitaires, des cancers et la susceptibilité aux infections chez la population vieillissante (Dejaco, 2006; Gregg, 2005).

Le phénomène de différenciation phénotypique des Treg et leur accumulation en périphérie sont observés chez les souris $CD47^{-/-}$ vieillissantes mais semblent être accélérés comparativement aux souris du type sauvage. Ce phénomène est

probablement le résultat d'une activation répétitive des Lc T en absence du signal négatif que peut transmettre le CD47 durant l'exposition des Lc T aux antigènes de soi ou aux pathogènes de l'environnement.

Mécanismes possibles de l'accumulation des Treg activées chez les souris CD47^{-/-}

La génération des Lc T CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ possédant une fonction régulatrice n'est pas confinée au thymus et plusieurs mécanismes d'induction « extra-thymique » ont été décrits. Chez les souris CD47^{-/-}, l'augmentation des Treg n'a pas été visible dans le thymus, les mécanismes périphériques sont donc considérés. Plusieurs possibilités peuvent éventuellement être responsables de cette augmentation (figure 16) une expansion et une activation des Treg naturelles provenant du thymus favorisées en périphérie par l'absence du CD47 ou 2) une génération *de novo* de Treg adaptatives ou induites par conversion périphérique résultant de l'action de certaines cytokines (IL-2, IL-10 ou autre cytokine non identifiée) secrétées abondamment par des cellules hyperactivées en absence du CD47.

Les résultats apportés par l'étude phénotypique des Lc CD4⁺ sont aussi en faveur d'un développement périphérique des Treg chez la souris CD47^{-/-}. La forte expression de ICOS sur la population de cellules augmentées dans les ganglions périphériques est caractéristique d'une population de T régulateurs induites en périphérie nommée « Th1 like-Treg ». Les Th1 like-Treg se distinguent des Treg naturels par l'expression du T-bet (facteur de transcription associé au phénotype Th1) et par la sécrétion élevée d'IFN- γ et d'IL-10 *in vitro* (Stock, 2004; Vermeiren, 2004). Il sera donc à vérifier si les cellules CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺CD44^{hi} de la souris CD47 expriment T-bet et à doser leur sécrétion d'IFN- γ et d'IL-10 pour déterminer s'il s'agit bien de cette population particulière de Treg.

D'autre part, l'observation de l'hyperactivation des cellules effectrices CD4⁺CD47^{-/-} *in vitro* est en accord avec des résultats obtenus sur les cellules humaines indiquant un rôle inhibiteur du CD47 sur l'activation des Lc T par leur récepteur (Avice, 2001; Avice, 2000; Latour, 2001; Li, 2001). En effet, nos résultats démontrent que les cellules CD4⁺ totaux et CD4⁺CD25⁻ effectrices sont plus activables en absence du

CD47 et secrètent des quantités plus élevées d'INF γ , d'IL-2 et d'IL-10 lorsqu'elles sont activées *in vitro* avec l'antigène. Ceci nous permet de suggérer un rôle de l'IL-2 dans l'augmentation de la proportion des Treg chez la souris CD47^{-/-}. En absence du CD47, l'IL-2 pourra causer l'expansion des Treg naturelles originaires du thymus ou aussi induire la conversion des cellules effectrices hyper-activées en Treg (Knoechel, 2005).

Il est aussi possible que les cellules augmentées chez les souris CD47^{-/-} soient des Tr1 induites par la forte sécrétion d'IL-10 provenant des cellules effectrices. La description actuelle des cellules Tr1 confirme que ces cellules acquièrent l'expression de CD25 et Foxp3 lors de leur activation (Battaglia, 2006; Levings, 2005). L'expression augmentée du CD44 et celle diminuée du CD62L sur ces cellules sont le témoin de leur état d'activation. Dans ce cas, le seul moyen qui distingue les Tr1 des Treg sera le mécanisme de suppression *in vitro*. Contrairement aux Treg qui suppriment par un mécanisme contact dépendant *in vitro*, les Tr1 suppriment via la sécrétion d'IL-10 principalement (Battaglia, 2006; Levings, 2005).

Toutefois nous n'écartons pas la possibilité d'une génération thymique de cellules précurseur de Treg de phénotype CD4⁺CD25⁻Foxp3^{lo} qui augmenteront leur expression de CD25 et de Foxp3 suite à une activation périphérique favorisée par l'environnement CD47^{-/-}.

Les différentes possibilités pouvant expliquer l'augmentation de la proportion de Treg chez les souris CD47^{-/-}, comme discuté dans la partie qui précède, sont résumées dans le modèle suggéré par la figure 16.

IV.2. Rôle du CD47 dans la fonction suppressive des Treg *in vitro* et *in vivo*

La fonction suppressive des Lc T régulateurs naturels est diminuée en absence du CD47

Certaines cytokines et molécules de costimulation sont capables de moduler la fonction suppressive des Treg et peuvent ainsi servir différemment la réponse immunitaire. L'abrogation de la suppression des Treg est nécessaire pour l'installation d'une réponse immunitaire efficace. La favorisation de la suppression est utile dans les cas d'hyperactivation, pour mettre fin à une réaction, pour assurer la tolérance aux greffes et surtout pour éliminer toute réactivité de nature autoimmune. L'engagement des récepteurs du type Toll (TLR) par des produits microbiens induit la maturation des cellules dendritiques impliquant la sécrétion de l'IL-6 et de l'IL-12, deux cytokines nécessaires pour libérer les cellules effectrices de l'effet des Treg et donc permettre l'élimination du pathogène. *In vitro*, l'abrogation de l'état d'anergie des Treg assuré par différents mécanismes de stimulation démontre que les Treg perdent leur fonction suppressive quand elles prolifèrent. Une forte activation des Treg *in vitro* par la stimulation du récepteur T accompagnée de la liaison du CD28 abroge leur anergie et leur fonction suppressive (Li, 2001). Le blocage du CTLA-4 ou du CD80 relève la suppression. Des membres de la superfamille des récepteurs des TNF "tumor necrosis factor" peuvent aussi directement modifier la fonction suppressive des Treg. Les signalisations via OX40, GITR, 4-1BB et RANK ont tous aussi démontré une capacité à bloquer la fonction des Treg. Il en est de même pour TRAF6, une protéine adaptatrice de certains membres des TNFRs (McHugh, 2002). D'autre part, des anticorps dirigés contre CD86 augmentent la suppression. Il en est de même pour certains pathogènes qui sont capables de promouvoir la fonction des Treg pour pouvoir se maintenir et échapper à l'élimination par les cellules effectrices, tel est le cas des infections à l'hépatite C et au *Helicobacter pylori* (Goleva, 2006; Lundgren, 2005; Sugimoto, 2003; Suttmüller, 2006).

Le mécanisme exact de suppression des Treg n'est pas complètement défini et les facteurs impliqués *in vitro* ne semblent pas nécessairement l'être *in vivo* et vice versa. Les études *in vitro* ont démontré que la suppression dans ce cas résulte d'un contact cellulaire entre les Lc T effecteurs et les Treg et est indépendant de la production de cytokines suppressives (l'IL-10 ou le TGF- β). Les Treg isolés de souris IL-10^{-/-} ou TGF- β ^{-/-} ont une activité suppressive intacte *in vitro*. Cependant, l'IL-10 secrété par les Treg joue un rôle dans la suppression *in vivo* puisque le transfert adoptif de Treg IL-10^{-/-} était incapable de résoudre une colite comme le font les Treg du type sauvage. L'effet de l'IL-10 n'est pas toutefois observable dans le cas de la gastrite, ce qui laisse à croire que les Treg utilisent des mécanismes de suppression différents suivant le site impliqué. En ce qui concerne le TGF- β , les résultats sont controversés et la plupart des études sur des cellules humaines et de souris ont conclu que cette cytokine n'est pas indispensable pour la fonction suppressive des Treg ni dans sa forme secrétée ni quand elle reste attachée à la membrane (Wing, 2006). À noter qu'un rôle des Treg par l'intermédiaire du TGF- β était rapporté dans le contrôle du diabète de type I (Green, 2003).

L'autre candidat susceptible de jouer un rôle dans la fonction suppressive des Treg est le CTLA-4. Mais l'état actuel des connaissances ne permet pas encore de conclure clairement quand à l'impact de cette molécule sur la fonction suppressive des Lc T régulateurs. Le CTLA-4 est la molécule de costimulation la mieux caractérisée pour freiner l'activation des Lc T. Les souris CTLA-4 déficientes souffrent d'un désordre lymphoprolifératif dû à l'absence de ce signal négatif. Certains ont proposé que l'engagement du CD80 sur les cellules effectrices par le CTLA-4 sur les Treg induise la suppression des cellules cibles par un mécanisme de contact interne-externe « inside-out ». Ces résultats étaient par suite confrontés par le fait que les Treg CTLA-4^{-/-} demeurent suppressive *in vitro*. D'autres ont proposé un rôle indirect du CTLA-4 dans la suppression par l'induction de l'enzyme IDO dans l'environnement, cette enzyme diminue l'activation des Lc T (Fallarino, 2003). Dernièrement, une étude a démontré que les cellules qui expriment le CTLA-4 adhèrent mieux aux cellules présentatrices d'antigène (APCs) limitant ainsi l'interaction de ces dernières

avec les cellules effectrices et minimisant par ce fait l'activation lymphocytaire (Schneider, 2005; Wing, 2006).

Chez la souris, comme on l'a déjà discuté antérieurement, le rôle du Foxp3 dans la fonction suppressive des Treg est démontré par les études de transfections géniques; le cas n'est cependant pas pareil chez l'homme puisque l'expression ectopique de ce gène dans des CD4⁺ ne confère pas la fonction suppressive à ces dernières (Allan, 2005).

Le CD18 (aussi nommé LFA-1 ou CD11a), une molécule d'adhésion impliquée dans les contacts cellulaires et l'activation des Lc T, compte aussi parmi les molécules possiblement impliquées dans la fonction des Treg. Les CD4⁺CD25⁺ de souris CD18^{-/-}, démontraient une faible fonction suppressive *in vitro* et étaient même incapables de s'opposer au développement d'une colite induite *in vivo* par le transfert des CD4⁺CD25⁺ chez des receveurs lymphopéniques. (Marski, 2005)

En ce qui concerne l'implication du CD47 dans la fonction suppressive des Treg, nos résultats démontrent une tendance de diminution de la fonction suppressive *in vitro* des cellules CD4⁺CD25⁺CD47^{-/-} de jeunes souris (8-10 semaines). Chez les souris CD47^{-/-} plus âgées qui présentent une augmentation de la proportion des Treg activées, nous confirmons une diminution de la fonction suppressive *in vitro* et *in vivo*. Il est d'un grand intérêt de vérifier davantage si le déséquilibre de la composition des Treg chez les souris âgées CD47^{-/-} affecte la fonction de ces cellules *in vitro* et *in vivo*. Il sera donc préférable de réaliser cette étude chez des souris plus avancées dans l'âge (>36 semaines) et éventuellement fractionner par triage cellulaire les deux sous-populations de Treg (activées et naïves) et évaluer la fonction suppressive de chacune d'entre elles d'une manière plus directe. Un des facteurs qui nous limite dans le cadre de l'étude des fonctions cellulaires chez la souris CD47^{-/-} est la difficulté de réaliser des transferts adoptifs entre souris de type sauvage et CD47^{-/-}; puisque le CD47 est considéré un marqueur du soi, les cellules CD47^{-/-} sont rapidement éliminées par les macrophages d'un hôte WT lors du transfert (Okazawa, 2005; Oldenborg, 2000; Olsson, 2006). Cette limitation nous empêche ainsi

d'examiner la fonction suppressive des Treg CD47^{-/-} dans le modèle de colite expérimentale.

Plusieurs études se sont intéressées à déterminer si les deux sous-populations de Treg diffèrent par leur fonction suppressive respectivement *in vivo* et *in vitro*. *In vitro* les capacités suppressives des deux sous-populations étaient considérées équivalentes (Szanya, 2002; Thornton, 2000). *In vivo*, les premières études ont démontré que seul le co-transfert de la sous-population de Treg naïves CD62L^{hi} était capable de prévenir le développement d'autoimmunité et de supprimer un GVHD létal (Ermann, 2006; Taylor, 2004). À l'opposé, une dernière étude a démontré que la sous population de Treg activées, grâce à l'expression d'une forme activée du CD44^{hi} liant l'Hyaluronan, détient une fonction suppressive supérieure dans un modèle de greffe de moelle osseuse (Firan, 2006).

La variation phénotypique entre les deux sous-populations de Treg implique une division du travail entre ceux-ci *in vivo*; les Treg naïves sont attirées vers les tissus lymphoïdes pour inhiber les réponses immunes dans la «phase du priming», alors que les Treg activées sont attirées vers les sites périphériques où prend place l'inflammation «phase effectrice». Une meilleure compréhension de l'hypothèse de division de tâche entre les Treg naïves et activées peut avoir un impact sur l'utilisation de ces cellules dans différentes applications thérapeutiques (Huehn, 2005). Chez les souris CD47^{-/-}, l'expression accrue du CD103 à la surface des Treg activées (tableaux III et IV) favorise un rôle prépondérant de ces cellules dans les sites périphériques.

En ce qui concerne l'effet du vieillissement sur la fonction des Treg, une étude a comparé la fonction suppressive des Treg de patients en santé âgés entre 22 et 60 ans et conclu une perte de cette fonction avec le vieillissement (Tsaknaridis, 2003). Tandis que d'autres étaient incapables de confirmer cette hypothèse (Gregg, 2005). Chez la souris non manipulée, une récente étude a démontré que le nombre de Treg augmente légèrement avec l'âge sans que la fonction de ces cellules ne soit affectée (Nishioka, 2006).

IV.3. Rôle du CD47 dans la fonction des cellules effectrices $CD4^+CD25^-$

Les cellules effectrices $CD4^+CD25^-$ sont hyperactivables en absence du CD47

Nos résultats de stimulation *in vitro* démontrent clairement que l'absence du CD47 de la surface des Lc $CD4^+$ favorise la production accrue de cytokines par ces cellules (figure 13). La variété de cytokines secrétées par ces cellules est particulière, groupant le facteur de croissance des Lc T (l'IL-2), la cytokine inflammatoire Th_1 (IFN γ) et la cytokine suppressive des Lc T (l'IL-10). *In vivo*, après immunisation, nos résultats de restimulation sont aussi compatibles pour l'IFN γ (figure 15). Il sera donc nécessaire de vérifier la sécrétion d'IL-2 et d'IL-10 dans le contexte *in vivo*.

Nous proposons que le CD47 joue un rôle dans la co-inhibition des Lc T semblable à celui joué par le CTLA-4. Cependant les souris $CD47^{-/-}$ ne présentent pas le même désordre décrit chez les souris $CTLA-4^{-/-}$. Ceci peut avoir deux explications : 1) le CTLA-4 est possiblement impliqué davantage dans la fonction des Treg. 2) l'absence du CD47 engendre une activation lymphocytaire qui se traduit par la forte sécrétion d'IL-10, cytokine suppressive capable de s'opposer à l'hyper-activation lymphocytaire et d'induire une famille de cellules T régulatrices qui compense dans les deux cas le manque du signal négatif assuré normalement par le CD47. Mais puisque les Treg induites $CD4^+CD25^+CD47^{-/-}$ démontraient une forte réduction de leur fonction suppressive, il est possible que ces souris possèdent, en plus de l'IL-10, un autre moyen leur permettant de se protéger contre l'hyper-activation lymphocytaire et le développement d'auto-immunité. Il sera donc nécessaire de vérifier l'existence d'autres populations régulatrices et/ou mécanismes supresseurs chez les vieilles souris $CD47^{-/-}$.

Section V

Conclusions et perspectives

Les résultats que nous avons générés nous permettent de conclure à une augmentation du pourcentage des Treg $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ parmi les $CD4^+$ périphériques chez les souris $CD47^{-/-}$. Cette augmentation est observée à partir de l'âge de 12 semaines, s'accroît en fonction du vieillissement et est principalement due à une augmentation de la population activée de Treg ($CD44^{hi}$). Par ceci nous décrivons la première molécule impliquée dans le contrôle négatif de la taille du réservoir des Treg et leur activation. L'existence d'un mécanisme contrôlant ce réservoir est nécessaire pour assurer l'équilibre immunitaire. Une proportion très élevée de Treg peut engendrer un défaut dans l'installation des réponses défensives contre les pathogènes et les cellules tumorales.

Nous avons aussi déterminé plusieurs facteurs qui pourraient être responsables de cette augmentation de Treg activées notamment, l'hyperactivation cellulaire et les fortes sécrétions d'IL-2 et d'IL-10 par les cellules $CD4^+CD25^-CD47^{-/-}$.

Le TGF- β est une autre cytokine impliquée dans l'induction de Treg *in vitro* et *in vivo* chez l'homme et chez la souris (Chen, 2003b; Huber, 2004; Rao, 2005). Il est rapporté que l'addition exogène de quelques nanogrammes de cette cytokine sur des cultures *ex-vivo* de cellules conventionnelles $CD4^+CD25^-Foxp3^-$ les transforme en véritables cellules suppressives $CD4^+CD25^+Foxp3^+$. Il sera donc intéressant de doser la sécrétion de TGF- β chez les souris $CD47^{-/-}$.

La détermination de la nature de ces Treg $CD47^{-/-}$ pourra éventuellement nous aider à comprendre les mécanismes exacts responsables de cette accumulation périphérique.

En ce qui concerne le rôle du CD47 sur la fonction suppressive des Treg, nos résultats *in vitro* et *in vivo* démontrent une baisse nette de cette fonction chez les vieilles souris $CD47^{-/-}$ comparativement avec la fonction des Treg de souris Balb/C. Il sera intéressant de déterminer si ce défaut dans la fonction régulatrice est dû uniquement à

l'augmentation de la population de Treg activées $CD4^+CD25^+CD44^{hi}Foxp3^+$ chez les souris âgées ou s'il s'agit d'un défaut global des $CD4^+CD25^+CD47^{-/-}$.

Puisque nous démontrons une baisse de la fonction suppressive des Treg chez les souris $CD47^{-/-}$ et que ces souris ne présentent pas de maladies autoimmunes visibles, il sera important de vérifier si elles développent en vieillissant des manifestations autoimmunes invisibles cliniquement (tel que la présence des auto-anticorps dans le sérum et/ou la présence d'infiltration lymphocytaire dans différents organes) ou encore si elles développent la gastrite qui est la maladie auto-immune développée par les souris de génotype Balb/C. Il sera préférable de réaliser ces études ou toutes autres études fonctionnelles des Treg avec des souris plus vieilles (surtout si l'augmentation de Treg activées continue de s'accroître durant le vieillissement). Toutefois, il est probable que ces souris développent d'autres moyens impliqués dans le maintien de la tolérance du soi qui méritent aussi être investigués.

Finalement, les nouvelles études de visionnement de la fonction des Treg *in vivo*, dans leur environnement naturel, ont révélé des interactions entre les Treg et les cellules dendritiques et non pas entre les Treg et les cellules effectrices. Ces données suggèrent que les Treg fonctionnent *in vivo* en ciblant la présentation antigénique (Tadokoro, 2006; Tang, 2006a). Plusieurs études *in vitro* ont aussi présenté des évidences que les Treg modifient les DCs en diminuant leur expression de molécules de costimulation, des molécules du CMH classe II et en limitant leur sécrétion d'IL-12 (Tang, 2006b). D'autres part, la capacité des DCs matures à induire et expandre les Treg *in vivo* et *in vitro* était aussi reportée par un nombre d'études (Jonuleit, 2000; Fehérvári, 2004c; Wakkach, 2003; Yamazaki, 2003; Steinman, 2003). À première vue, une interaction bidirectionnelle entre Treg et DCs est possible; cependant la relation exacte entre ces deux joueurs importants du système immunitaire a sans doute besoin de plus d'investigation.

Des études antérieures dans le laboratoire du Dr. Sarfati ont démontré, chez l'homme, un rôle régulateur du CD47 sur la maturation et les fonctions des DCs (Avice, 2000; Demeure, 2000); cet effet régulateur était de même confirmé chez les souris $CD47^{-/-}$.

(Hagnerud, 2006). L'influence des Treg sur les DCs, ou vice versa, sera donc un point important à vérifier chez les souris CD47^{-/-}.

Par ses multiples actions - parfois opposées - sur les cellules effectrices, sur les lymphocytes T régulateurs ou sur les cellules dendritiques, le CD47 démontre effectivement un potentiel dans la régulation des réactions immunitaires et le modèle de souris CD47 déficientes représente un outil d'investigation qui facilitera la compréhension du rôle précis de cette molécule.

Liste des Références

Agace W.W., MG Higgins J., Sadasivan B., Brenner M.B. and Parker C.M. T-lymphocyte-epithelial-cell interactions: integrin αE (CD103) $\beta 7$, LEEP-CAM and chemokines. *Current Opinion in Cell Biology*. 12 (5):563-568, 2000.

Allan S.E., Passerini L., Bacchetta R., Crellin N., Dai M., Orban P.C., Ziegler S.F., Roncarolo M.G. and Levings M.K. The role of 2 FOXP3 isoforms in the generation of human CD4⁺ Tregs. *The Journal of Clinical Investigation*. 115 (11):3276-3284, 2005.

Almeida A., Rocha B., Freitas A.A. and Tanchot C. Homeostasis of T cell numbers: from thymus production to peripheral compartmentalization and the indexation of regulatory T cells. *Seminars in Immunology*. 17 (3):239-249, 2005.

Almeida A., Zaragoza B. and Freitas A.A. Indexation as a Novel Mechanism of Lymphocyte Homeostasis: The Number of CD4CD25 Regulatory T Cells Is Indexed to the Number of IL-2-Producing Cells. *The Journal of Immunology*. 177 (1):192-200, 2006.

Apostolou. I. and Von Boehmer H. In vivo instruction of suppressor commitment in naïve T cells. *The Journal of Experimental Medicine*. 199 (10):1401-1408, 2004.

Armant M., Avice M-N., Hermann P., Rubio M., Kiniwa M., Delespesse G. and Sarfati M. CD47 ligation selectively downregulates human interleukin 12 production. *The Journal of Experimental Medicine*. 190 (8):1175-1181, 1999.

Asseman C., Mauze S., Leach M.W., Coffman R.L. and Powrie F. An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation. *The Journal of Experimental Medicine*. 190 (7):995-1004, 1999.

Avice M-N., Rubio M., Sergerie M., Delespesse G. and Sarfati M. CD47 ligation selectively inhibits the development of human naive T cells into Th1 effectors. *The Journal of Immunology*. 165 (8):4624-4631, 2000.

Avice M-N., Rubio M., Sergerie M., Delespesse G. and Sarfati M. Role of CD47 in the induction of human naive T cell anergy. *The Journal of Immunology*. 167 (5):2459-2468, 2001.

Baecher-Allan C. and Hafler D. A. Suppressor T cells in human diseases. *The Journal of Experimental Medicine*. 200 (3):273-276, 2004.

Barrat F.J., Cua D.J., Boonstra A., Richards D.F., Crain C., Savelkoul H.F., De Waal-Malefyt R., Coffman R.L., Hawrylowicz C.M. and O'Garra A. In vitro generation of interleukin 10-producing regulatory CD4⁺ T cells is induced by immunosuppressive drugs and inhibited by T helper type 1 (Th1) -and Th2- inducing cytokines. *The Journal of Experimental Medicine*. 195 (5):603-616, 2002.

Battaglia M., Gregoria S., Bacchetta R. and Roncarolo M.G. Tr1 cells: From discovery to their clinical application. *Seminars in Immunology* 18 (2):120-127, 2006.

Beissert S., Schwarz A. and Schwarz T. Regulatory T Cells. *The Journal of Investigative Dermatology*. 126 (1):15-24, 2006.

Bennett C.L., Christie J., Ramsdell F., Brunkow M.E., Ferguson P.J., Whitesell L., Kelly T.E., Saulsbury F.T., Chance P.F. and Ochs H.D. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nature Genetics*. 27 (1):20-21, 2001.

Brunkow M.E., Jeffery E.W., Hjerrild K.A., Paepers B., Clark L.B., Yasayko S.A., Wilkinson J.E., Galas D., Ziegler S.F. and Ramsdell F. Disruption of a new

forkhead/winged-helix protein, scurfy, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nature Genetics*. 27 (1):68-73, 2001.

Brusko T.M., Wasserfall C.H., Clare-Salzler M.J., Schatz D.A. and Atkinson M.A. Functional Defects and the Influence of Age on the Frequency of CD4CD25 T-Cells in Type 1 Diabetes. *Diabetes*. 54 (5):1407-1414, 2005.

Campbell J.J., Murphy K.E., Kunkel E.J., Brightling C.E., Soler D., Shen Z, Boisvert J., Greenberg H.B., Vierra M.A., Goodman S.B., Genovese M.C., Wardlaw A.J., Butcher E.C. and Wu L. CCR7 expression and memory T cell diversity in humans. *The Journal of Immunology*. 166 (2):877-884, 2001.

Cederbom L., Hall H. and Ivars F. CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells down-regulate co-stimulatory molecules on antigen-presenting cells. *European Journal of Immunology*. 30 (6):1538–1543, 2000.

Chang X., Zheng P. and Liu Y. FoxP3: A genetic link between immunodeficiency and autoimmune diseases. *Autoimmunity Reviews*. 5 (6):399-402, 2006.

Chen W., Jin W., Hardegen N., Lei K.J., Li L., Marinos N., McGrady G. and Wahl S.M. Conversion of peripheral CD4⁺CD25⁻ naive T cells to CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *The Journal of Experimental Medicine*. 198 (12):1875-1886, 2003a.

Chen Y., Kuchroo V.K., Inobe J., Hafler D.A. and Weiner H.L. Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis. *Science*. 265 (5176):1237-1240, 1994.

Chen Z-m., O'Shaughnessy M.J., Gramaglia I., Panoskaltsis-Mortari A., Murphy W.J., Narula S., Roncarolo M.G. and Blazar B.R. IL-10 and TGF-β induce alloreactive CD4⁺CD25⁻ T cells to acquire regulatory cell function. *Blood*. 101 (12):5076-5083, 2003.

Coombes J.L., Robinson N.J., Maloy K.J., Uhlig H.H. and Powrie F. Regulatory T cells and intestinal homeostasis. *Immunological Reviews*. 204:184-194, 2005.

Cooper D., Lindberg F.P., Gamble J.R., Brown E.J. and Vadas M.A. Transendothelial migration of neutrophils involves integrin-associated protein (CD47). *The Proceedings of the National Academy of Sciences online USA*. 92 (9):3978-3982, 1995.

De la rosa M., Rutz S., Dorninger H. and Scheffold A. Interleukin-2 is essential for CD4⁺CD25⁺ regulatory T cell function. *European Journal of Immunology*. 34 (9):2480-2488, 2004.

Dejaco C., Duftner C. and Schirmer M. Are regulatory T-cells linked with aging? *Experimental Gerontology*. 41 (4):339-345, 2006.

Demeure C.E., Tanaka H., Mateo V., Rubio M., Delespesse G. and Sarfati M. CD47 engagement inhibits cytokine production and maturation of human dendritic cells. *The Journal of Immunology*. 164 (4):2193-2199, 2000.

Dujardin H.C., Burlen-Defranoux O., Boucontet L., Vieira P., Cumano A. and Bandeira A. Regulatory potential and control of Foxp3 expression in newborn CD4CT cells. *The Proceedings of the National Academy of Sciences online USA*. 101 (40):14473-14478, 2004.

Eaton S.M., Burns E.M., Kusser K., Randall T.D. and Haynes L. Age-related defects in CD4 T cell cognate helper function lead to reductions in humoral responses. *The Journal of Experimental Medicine*. 200 (12):1613–1622, 2004.

Ermann J., Hoffmann P., Edinger M., Dutt S., Blankenberg F.G., Higgins J. P., Negrin R.S., Fathman C.G. and Strober S. Only the CD62L⁺ subpopulation of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells protects from lethal acute GVHD. *Blood*. 105 (5):2220-2226, 2006.

Fallarino F., Grohmann U., Hwang K.W., Orabona, C., Vacca C., Bianchi R., Belladonna M.L., Fioretti M.C., Alegre M.L. and Puccetti P. Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. *Nature Immunology*. 4 (12):1206-1212, 2003.

Fehérvári Z. and Sakaguchi S. CD4⁺ Tregs and immune control. *The Journal of clinical investigation*. 114 (9):1209-1217, 2004a.

Fehérvári Z. and Sakaguchi S. Development and function of CD25⁺CD4⁺ regulatory t cells. *Current Opinion in Immunology*. 16 (2):203-208, 2004b.

Fehérvári Z. and Sakaguchi S. Control of Foxp3⁺CD25⁺CD4⁺ regulatory cell activation and function by dendritic cells. *International Immunology*. 16 (12):1769-1780, 2004c.

Fehérvári Z., Yamaguchi T. and Sakaguchi S. The dichotomous role of IL-2: tolerance versus immunity. *Trends in Immunology*. 27 (3):109-111, 2006.

Firan M., Dhillon S., Estess P. and Siegelman M.H. Suppressor activity and potency among regulatory T cells is discriminated by functionally active CD44. *Blood*. 107 (2):619-626, 2006.

Fisson S., Darrasse-Jeze G., Litvinova E., Septier F., Klatzmann D., Liblau R. and Salomon B.L. Continuous activation of autoreactive CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in the steady state. *The Journal of Experimental Medicine*. 198 (5):737-746, 2003.

Fontenot J.D., Gavin M.A. and Rudensky A.Y. Foxp3 programs the development and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Nature Immunology*. 4 (4): 330-336, 2003.

Fontenot J.D. and Rudensky A.Y. Molecular aspects of regulatory T cell development. *Seminars in Immunology*. 16 (2):73-80, 2004.

Fontenot J.D., Rasmussen J.P., Williams L.M., Dooley J.L., Farr A.G. and Rudensky A.Y. Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor Foxp3. *Immunity*. 22 (3):329-341, 2005.

Frey O., Petrow P.K., Gajda M., Siegmund K., Huehn J., Scheffold A., Hamann A., Radbruch A. and Brauer R. The role of regulatory T cells in antigen-induced arthritis: aggravation of arthritis after depletion and amelioration after transfer of CD4⁺CD25⁺ T cells. *Arthritis Research and Therapy*. 7 (2):R291-R301, 2005.

Fu S., Yopp A.C., Mao X., Chen D., Zhang N., Chen D., Mao M., Ding Y. and Bromberg J.S. CD4⁺CD25⁺CD62⁺ T-regulatory cell subset has optimal suppressive and proliferative potential. *American Journal of Transplantation*. 4 (1):65-78, 2004.

Furtado G.C., Curotode O-D, Lafaille M.A., Wensky A.K., Latkowski J.A. and Lafaille J.J. Regulatory T cells in spontaneous autoimmune encephalomyelitis. *Immunological Reviews*. 182:122-134, 2001.

Gardai S.J., McPhillips K.A., Frasch C., Janssen W.J., Starefeldt A., Murphy-Ullrich J.E., Bratton D.L., Oldenborg P-A., Michalak M. and Henson P. M. Cell surface calreticulin initiates clearance of viable or apoptotic cells through trans activation of LRP on the phagocyte. *Cell*. 123 (2): 321-334, 2005.

Gardai S.J., Bratton D.L., Ogden C.A. and Henson P.M. Recognition ligands on apoptotic cells: a perspective. *Journal of Leukocyte Biology*. 79 (5):896-903, 2006.

Goleva E., Cardona I.D., Ou L.S. and Leung D.Y. Factors that regulate naturally occurring T regulatory cell-mediated suppression. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 116 (5):1094-1100, 2006.

Gorelik L. and Flavell R.A. Transforming growth factor-beta in T-cell biology. *Nature Reviews Immunology*. 2 (1):46-53, 2002.

Green E.A., Gorelik L., McGregor C.M., Tran E.H. and Flavell R.A. CD4⁺CD25⁺ T regulatory cells control anti-islet CD8⁺ T cells through TGF-beta-TGF-beta receptor interactions in type 1 diabetes. The Proceedings of the National Academy of Sciences online USA. 100 (19):10878-10883, 2003.

Gregg R., Smith C.M., Clark F.J., Dunnion D., Khan N., Chakraverty R., Nayak L. and Moss P.A. The number of human peripheral blood CD4⁺CD25^{high} regulatory T cells increases with age. Clinical and Experimental Immunology. 140 (3):540-546, 2005.

Gresham H.D., Lowrance J.H., Caver T.E., Wilson B.S., Cheung A.L. and Lindberg F.P. Survival of Staphylococcus aureus inside neutrophils contributes to infection. The Journal of Immunology. 164 (7):3713-3722, 2000.

Grimbert P., Bouguermouh S., Baba N., Nakajima T., Allakhverdi Z., Braun D., Saito H., Rubio M., Delespesse G. and Sarfati M. Thrombospondin/CD47 interaction: a pathway to generate regulatory T cells from human CD4⁺CD25⁻ T cells in response to inflammation. The Journal of Immunology. 177 (6):3534-3541, 2006.

Hagnerud S., Manna P.P., Cella M., Stenberg A., Frazier W.A., Colonna M. and Oldenborg PA. Deficit of CD47 results in a defect of marginal zone dendritic cells, blunted immune response to particulate antigen and impairment of skin dendritic cell migration. The Journal of Immunology. 176 (10):5772-5778, 2006.

Haynes L., Eaton S.M., Burns E.M., Randall T.D. and Swain S.L. CD4 T cell memory derived from young naive cells functions well into old age, but memory generated from aged naive cells functions poorly. The Proceedings of the National Academy of Sciences online USA. 100 (25):15053-15058, 2003.

Hori S., Nomura T. and Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. Science. 299(5609):1057-61, 2003.

Huang C.T., Workman C.J., Flies D., Pan X., Marson A.L., Zhou G., Hipkiss E.L., Ravi S., Kowalski J., Levitsky H.I., Powell J.D., Pardoll D.M., Drake C.G. and Vignali D.A. Role of LAG-3 in regulatory T cells. *Immunity* 21 (4):503-513, 2004.

Huber S., Schramm C., Lehr H.A., Mann A., Schmitt S., Becker C., Protschka M., Galle P.R., Neurath M.F. and Blessing M. Cutting edge: TGF-beta signaling is required for the in vivo expansion and immunosuppressive capacity of regulatory CD4⁺CD25⁺ T cells. *The Journal of Immunology*. 173 (11):6526-6531, 2004.

Huehn J. and Hamann A. Homing to suppress: address codes for Treg migration. *Trends in Immunology*. 26 (12):632-636, 2005.

Itoh M., Takahashi T., Sakaguchi N., Kuniyasu Y., Shimizu J., Otsuka F. and Sakaguchi S. Thymus and autoimmunity: production of CD25⁺CD4⁺ naturally anergic and suppressive T cells as a key function of the thymus in maintaining immunologic self-tolerance. *The Journal of Immunology*. 162 (9):5317-5326, 1999.

Jonuleit H., Schmitt E., Schuler G., Knop J. and Enk A.H. Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating CD4 (+) T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells. *The Journal of Experimental Medicine*. 192 (9):1213-1222, 2000.

Jonuleit H., Schmitt E., Kakirman H., Stassen M., Knop J. and Enk A.H. Infectious tolerance: human CD25⁺ regulatory T cells convey suppressor activity to conventional CD4⁺ T helper cells. *The Journal of Experimental Medicine*. 196 (2):255-260, 2002.

Jordan M.S., Boesteanu A., Reed A.J., Petrone A.L., Hohenbeck A.E and Lerman M.A. Thymic selection of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells induced by an agonist self-peptide. *Nature Immunology*. 2 (4):301-306, 2001.

Kawahata K., Misaki Y., Yamauchi M., Tsunekawa S., Setoguchi K., Miyazaki J. and Yamamoto K. Generation of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells from autoreactive T

cells simultaneously with their negative selection in the thymus and from nonautoreactive T cells by endogenous TCR expression. *The Journal of Immunology*. 168 (9):4399-4405, 2002.

Kharitonov A., Chen Z., Sures I., Wang H., Schilling J. and Ullrich, A. A family of proteins that inhibit signaling through tyrosine kinase receptors. *Nature*. 386 (6621):181-186, 1997.

Khatti R., Cox T., Yasayko S.A. and Ramsdell F. An essential role for Scurfin in CD4⁺CD25⁺ T regulatory cells. *Nature Immunology*. 4 (4):337-342, 2003.

Knoechel B., Lohr J., Kahn E., Bluestone J.A. and Abbas A.K. Sequential development of interleukin 2-dependent effector and regulatory T cells in response to endogenous systemic antigen. *The Journal of Experimental Medicine*. 202 (10):1375-1386, 2005.

Kohm A.P., Carpentier P.A., and Miller S.D. Regulation of experimental autoimmune encephalomyelitis EAE by CD4⁺CD25⁺ regulatory T Cells. *Novartis Foundation Symposium*. 252:106-114, 2006.

Kohm A.P., McMahon J.S., Podajil J.R., Begolka W.S., DeGutes M., Kasprovicz D.J., Ziegler S.F. and Miller S.D. Cutting Edge: Anti-CD25 monoclonal antibody injection results in the functional inactivation, not depletion, of CD4CD25 T Regulatory Cells. *The Journal of Immunology* 176 (6):3301-3305, 2006.

Kretschmer K., Apostolou I., Hawiger D., Khazaie K., Nussenzweig M.C. and von Boehmer H. Inducing and expanding regulatory T cell populations by foreign antigen. *Nature Immunology*. 6 (12):1219-1227, 2005.

Kronenberg M. and Rudensky A. Regulation of immunity by self-reactive T cells. *Nature*. 435 (7042):598-604, 2006.

Kumanogoh A., Wang X., Lee I., Watanabe C., Kamanaka M., Shi W., Yoshida K., Sato T., Habu S., Itoh M., Sakaguchi N., Sakaguchi S. and Kikutani H. Increased T cell autoreactivity in the absence of CD40-CD40 ligand interactions: a role of CD40 in regulatory T cell development. *The Journal of Immunology*. 166 (1):353-360, 2001.

Lan R.Y., Ansari A.A., Lian Z-X. and Gershwin M.E. Regulatory T cells: Development, function and role in autoimmunity. *Autoimmunity Reviews*. 4 (6):351-363, 2005.

Latour S., Tanaka H., Demeure C., Mateo V., Rubio M., Brown E.J., Maliszewski C., Lindberg F.P., Oldenborg A., Ullrich A., Delespesse G. and Sarfati M. Bidirectional negative regulation of human T and dendritic cells by CD47 and its cognate receptor signal-regulator protein- α : down-regulation of IL-12 responsiveness and inhibition of dendritic cell activation. *The Journal of Immunology*. 167 (5):2547-2554, 2001.

Leibson P.J. The regulation of lymphocyte activation by inhibitory receptors. *Current Opinion in Immunology*. 16 (3):328-336, 2004.

Levings M.K., Gregori S., Tresoldi E., Cazzaniga S., Bonini C. and Roncarolo M.G. Differentiation of Tr1 cells by immature dendritic cells requires IL-10 but not CD25⁺CD4⁺ Tr cells. *Blood*. 105 (3):1162-1169, 2005.

Li Z., Calzada M.J., Sipes J.M., Cashel J.A., Kruttsch H.C., Annis D.S., Mosher D.F. and Roberts D.D. Interactions of thrombospondins with $\alpha 4\beta 1$ integrin and CD47 differentially modulate T cell behavior. *The Journal of Cell Biology*. 157 (3):509-519, 2002.

Li Z., He L., Wilson K. and Roberts D. Thrombospondin-1 inhibits TCR-mediated T lymphocyte early activation. *The Journal of Immunology*. 166 (4):2427, 2001.

Lindberg F.P., Bullard D.C., Caver T.E., Gresham H.D., Beaudet A.L. and Brown E.J. Decreased resistance to bacterial infection and granulocyte defects in IAP-deficient mice. *Science*. 274 (5288):795-798, 1996.

Lohning M., Hutloff A., Kallinich T., Mages H.W., Bonhagen K., Radbruch A., Hamelmann E. and Krocze R.A. Expression of ICOS in vivo defines CD4⁺ effector T cells with high inflammatory potential and a strong bias for secretion of interleukin 10. *The Journal of Experimental Medicine*. 197 (2):181-193, 2003.

Lohr J., Knoechel B., Jiang S., Sharpe A.H. and Abbas A.K. The inhibitory function of B7 costimulators in T cell responses to foreign and self-antigens. *Nature Immunology*. 4 (7):664-669, 2003.

Lundgren A., Stromberg E., Sjoling A., Lindholm C., Enarsson K. and Edebo A., Mucosal FOXP3-expressing CD4⁺ CD25^{high} regulatory T cells in *Helicobacter pylori*-infected patients. *Infection and Immunology*. 73 (1):523-531, 2005.

Maggi E., Cosmi L., Liotta F., Romagnani P., Romagnani S. and Annunziato F. Thymic regulatory T cells. *Autoimmunity Reviews*. 4 (8):579-586, 2005.

Maile R., Pop S.M., Tisch R., Collins E.J., Cairns B.A. and Frelinger J.A. Low-avidity CD8^{lo} T cells induced by incomplete antigen stimulation in vivo regulate naive higher avidity CD8^{hi} T cell responses to the same antigen. *European Journal of Immunology*. 36 (2):397-410, 2006.

Malek T.R. The main function of IL-2 is to promote the development of T regulatory cells. *Journal of Leukocyte Biology*. 74 (6):961-965, 2003.

Malek T.R., Yu A., Vincek V., Scibelli P. and Kong L. CD4 regulatory T cells prevent lethal autoimmunity in IL-2Rbeta-deficient mice. Implications for the nonredundant function of IL-2. *Immunity*. 17 (2):167-178, 2002.

Manna P.P. and Frazier W.A. The Mechanism of CD47-Dependent Killing of T Cells: Heterotrimeric Gi-Dependent Inhibition of Protein Kinase A. *The Journal of Immunology*. 170 (7):3544-3553, 2003.

Marski M., Kandula S., Turner J.R. and Abraham C. CD18 is required for optimal development and function of CD4⁺CD25⁺ T regulatory cells. *The Journal of Immunology*. 175 (12):7889-7897, 2005.

Mateo V., Lagneaux L., Bron D., Biron G., Armant M., Delespesse G. and Sarfati M. CD47 ligation induces caspase-independent cell death in chronic lymphocytic leukemia. *Nature Medicine*. 5 (11):1277-1284, 1999.

McHugh R.S., Whitters M.J., Piccirillo C.A., Young D.A., Shevach E.M., Collins M. and Byrne M.C. CD4CD25 immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor. *Immunity*. 16 (2):311-323, 2002.

Miller R.A. The aging immune system: primer and prospectus. *Science*. 273 (5271):70-74, 1996.

Mitchison N.A. Induction of immunological paralysis in two zones of dosage. *Proceedings of the Royal Society of London B Biological Science*. 161:275-292, 1964.

Miyara M., Amoura Z., Parizot C., Badoual C., Dorgham K., Trad S., Kambouchner M., Valeyre D., Chapelon-Abric C., Debre P., Piette J.C. and Gorochoff G. The immune paradox of sarcoidosis and regulatory T cells. *The Journal of Experimental Medicine*. 203 (2):359-370, 2006.

Morrissey P.J., Charrier K., Braddy S., Liggitt D. and Watson J.D. CD4⁺ T cells that express high levels of CD45RB induce wasting disease when transferred into congenic severe combined immunodeficient mice. Disease development is prevented

by cotransfer of purified CD4⁺ T cells. *The Journal of Experimental Medicine*. 178 (1):237-244, 1993.

Munn D.H., Sharma M.D. and Mellor A.L. Ligation of B7-1/B7-2 by human CD4(+) T cells triggers indoleamine 2,3-dioxygenase activity in dendritic cells. *The Journal of Immunology*. 172 (7):4100–4110, 2004.

Nishibori T., Tanabe Y., Su L. and David M. Impaired Development of CD4⁺ CD25⁺ Regulatory T Cells in the Absence of STAT1: Increased Susceptibility to Autoimmune Disease. *The Journal of Experimental Medicine*. 199 (1): 25-34, 2003.

Nishioka T., Shimizu J., Iida R., Yamazaki S. and Sakaguchi S. CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T Cells and CD4⁺CD25⁻Foxp3⁺ T Cells in Aged Mice. *The Journal of Immunology*. 176 (6586):6593, 2006.

Nishizuka Y. and Sakakura T. Thymus and reproduction: sex-linked dysgenesis of the gonad after neonatal thymectomy in mice. *Science*. 166 (906):753-755, 1969.

Okazawa H., Motegi S., Ohyama N., Ohnishi H., Tomizawa T., Kaneko Y., Oldenborg P.A., Ishikawa O. and Matozaki T. Negative Regulation of Phagocytosis in Macrophages by the CD47-SHPS-1 System¹. *The Journal of Immunology*. 174 (4):2004-2011, 2005.

Oldenborg P.A. CD47 and SIRPs: new opening. *Blood*. 105 (6):2245-2246, 2005.

Oldenborg P.A., Zheleznyak A., Fang Y.F., Lagenaur C.F., Gresham H.D. and Lindberg F.P. Role of CD47 as a marker of self on red blood cells. *Science* 288 (5473):2051-2054, 2000.

Olsson M., Nilsson A. and Oldenborg P.A. Target cell CD47 regulates macrophage activation and erythrophagocytosis. *Transfusion Clinique et Biologique*. 13 (1-2): 39-43, 2006.

- Parkos C.A., Colgan S.P., Liang T.W., Nusrat A., Bacarra A.E., Carnes D.K. and Madara J.L. CD47 mediates post-adhesive events required for neutrophil migration across polarized intestinal epithelia. *The Journal of Cell Biology*. 132 (3):437-450, 1996.
- Pasare C. and Medzhitov R. Toll-dependent control mechanisms of CD4 T cell activation. *Immunity*. 21 (5):733-741, 2004.
- Penhale, W.J., Farmer A., McKenna R.P. and Irvine W.J. Spontaneous thyroiditis in thymectomized and irradiated Wistar rats. *Clinical and Experimental Immunology*. 15 (2):225-236, 1973.
- Pettersen R.D., Hestdal K., Olafsen M.K., Lie S.O. and Lindberg F.P. CD47 signals T cell death. *The Journal of Immunology*. 162 (12):7031-7040, 1999.
- Planck A., Katchar K., Eklund A., Gripenback S. and Grunewald J. T-lymphocyte activity in HLA-DR17 positive patients with active and clinically recovered sarcoidosis. *Sarcoidosis Vascular Diffuse Lung Disease*. 20 (2):110-117, 2003.
- Powrie F., Leach M.W., Mauze S., Caddle L.B. and Coffman R.L. Phenotypically distinct subsets of CD4⁺ T cells induce or protect from chronic intestinal inflammation in C. B-17 SCID mice. *International Immunology*. 5 (11): 1461-1471. 1993.
- Rao P.E., Petrone A.L. and Ponath P.D. Differentiation and Expansion of T Cells with Regulatory Function from Human Peripheral Lymphocytes by Stimulation in the Presence of TGF- β . *The Journal of Immunology*. 174 (3):1446-1455, 2005.
- Rebres R.A., Kajihara K. and Brown E.J. Novel CD47-dependent intercellular adhesion modulates cell migration. *Journal of Cell Physiology*. 205 (2):182- 193, 2005.

Reinhold M.I., Lindberg F.P., Kersh G.J., Allen P.M. and Brown E.J. Costimulation of T cell activation by integrin associated protein (CD47) is an adhesion dependent, CD28 independent signaling pathway. *The Journal of Experimental Medicine*. 185 (1):1-11, 1997.

Sadlack B., Merz H., Schorle H., Schimpl A., Feller A.C. and Horak I. Ulcerative colitis-like disease in mice with a disrupted interleukin-2 gene. *Cell*. 75 (2):253-261, 1993.

Sakaguchi S., Fukuma K., Kuribayashi K. and Masuda T. Organ-specific autoimmune diseases induced in mice by elimination of T cell subset. I. Evidence for the active participation of T cells in natural self-tolerance; deficit of a T cell subset as a possible cause of autoimmune disease. *The Journal of Experimental Medicine*. 161 (1):72-87, 1985.

Sakaguchi S., Sakaguchi N., Asano M., Itoh M. and Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *The Journal of Immunology*. 155 (3):1151-1164, 1995.

Sakaguchi S. Naturally arising CD4⁺ regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annual Reviews Immunology*. 22:531-562, 2004.

Sakaguchi S. Naturally arising Foxp3 expressing CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non self. *Nature Immunology*. 6 (4):345-352, 2005.

Salomon B., Lenschow D.J., Rhee L., Ashourian N., Singh B., Sharpe A. and Bluestone J.A. B7/CD28 Costimulation is essential for the homeostasis of the CD4⁺CD25⁺ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes. *Immunity*. 12 (4):431-440, 2000.

Seddon B. and Mason D. The third function of the thymus. *Immunolgy Today*. 21 (2):95-99, 2000.

Shevach E.M. CD4⁺CD25⁺ suppressor T cells: more questions than answers. *Nature Reviews Immunology*. 2 (6):389-400, 2002.

Shimizu J. and Moriizumi E. CD4⁺CD25⁻ T cells in aged mice are hyporesponsive and exhibit suppressive activity. *The Journal of Immunology*. 170 (4):1675-1682, 2003.

Seiffert M., Brossart P., Cant C., Cella M., Colonna M., Brugger W., Kanz L., Ullrich A. and Buhning H.J. Signal-regulatory protein alpha (SIRPalpha) but not SIRPbeta is involved in T-cell activation, binds to CD47 with high affinity, and is expressed on immature CD34(+)CD38(-) hematopoietic cells. *Blood*. 97 (9):2741-2749, 2001.

Siegmund K., Feuerer M., Siewert C., Ghani S., Haubold U., Dankof A., Krenn V., Schon M.P., Scheffold A., Lowe J.B., Hamann A., Syrbe U. and Huehn J. Migration matters: regulatory T-cell compartmentalization determines suppressive activity in vivo. *Blood*. 106 (9):3097-3104, 2005.

Sinclair N.R. Why so many coinhibitory receptors? *Scandinavian Journal of Immunology*. 50 (1):10-13, 1999.

Schneider H., Valk E., daRocha Dias S., Wei B. and Rudd C.E. CTLA-4 up-regulation of lymphocyte function-associated antigen 1 adhesion and clustering as an alternate basis for coreceptor function. *The Proceedings of the National Academy of Sciences online USA*. 102 (36):12861-12866 2005.

Steinman R.M., Hawiger D. and Nussenzweig M.C. Tolerogenic dendritic cells. *Annual Reviews Immunology*. 21:685-711, 2003.

Stock P., Akbari O., Berry G., Freeman G.J., Dekruyff R.H. and Umetsu D.T. induction of T helper type 1-like regulatory cells that express Foxp3 and protect against airway hyper-reactivity. *Nature Immunology*. 5 (11):1149-1156, 2004.

Suffia I., Reckling S.K., Salay G. and Belkaid Y. A Role for CD103 in the Retention of CD4CD25 Treg and Control of *Leishmania major* Infection. *The Journal of Immunology*. 174 (9):5444-5455, 2005.

Sugimoto K., Ikeda F., Stadanlick J., Nunes F.A., Alter H.J. and Chang K.M. Suppression of HCV-specific T cells without differential hierarchy demonstrated *ex vivo* in persistent HCV infection. *Hepatology*. 38 (6):1437–1448, 2003.

Surh C.D. and Sprent J. Regulation of mature T cell homeostasis. *Seminars in Immunology*. 17 (3):183-191, 2005.

Sutmuller R.P., Morgan M.E., Netea M.G., Grauer O. and Adema G.J. Toll-like receptors on regulatory T cells: expanding immune regulation. *Trends in Immunology*. 27 (8):387-393, 2006.

Suzuki H., Kundig T.M., Furlonger C., Wakeham A., Timms E., Matsuyama T., Schmits R., Simard J.J., Ohashi P.S. and Griesser H. Deregulated T cell activation and autoimmunity in mice lacking interleukin-2 receptor beta. *Science*. 268 (5216):1472-1476, 1995.

Szanya V., Ermann J., Taylor C., Holness C. and Fathman C.G. The subpopulation of CD4⁺CD25⁺ splenocytes that delays adoptive transfer of diabetes expresses L-selectin and high levels of CCR7. *The Journal of Immunology*. 169 (5):2461-2465, 2002.

Tadokoro C.E., Shakhar G., Shen S., Ding Y., Lino A.C., Maraver A., Lafaille J.J. and Dustin M.L. Regulatory T cells inhibit stable contacts between CD4⁺ T cells and dendritic cells in vivo. *The Journal of Experimental Medicine*. 203 (3):505-511, 2006.

Takahashi T., Kuniyasu Y., Toda M., Sakaguchi N., Itoh M., Iwata M., Shimizu J. and Sakaguchi S. Immunologic self-tolerance maintained by CD25⁺CD4⁺ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state. *International Immunology*. 10 (12):1969-1980, 1998.

Tang Q., Henriksen K.J., Boden E.K., Tooley A.J., Ye J., Subudhi S.K., Zheng X.X., Strom T.B. and Bluestone J.A. Cutting edge: CD28 controls peripheral homeostasis of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *The Journal of Immunology*. 171 (7):3348-3352, 2003.

Tang Q., Henriksen K.J., Bi M., Finger E.B., Szot G., Ye J., Masteller E.L., McDevitt H., Bonyhadi M. and Bluestone J.A. In vitro-expanded antigen-specific regulatory T cells suppress autoimmune diabetes. *The Journal of Experimental Medicine*. 199 (11):1455-1465, 2004.

Tang Q., Adams J.Y., Tooley A.J., Bi M., Fife B.T., Serra P., Santamaria P., Locksley R.M., Krummel M.F. and Bluestone J.A. Visualizing regulatory T cell control of autoimmune responses in nonobese diabetic mice. *Nature Immunology*. 7 (1):83-92, 2006a.

Tang Q. and Krummel M. F. Imaging the function of regulatory T cells in vivo. *Current Opinion in Immunology*. 18 (4):496-502, 2006b.

Taylor P.A., Panoskaltsis-Mortari A., Swedin J.M., Lucas P.J., Gress R.E., Levine B.L., June C.H., Serody J.S. and Blazar B.R. L-selectin^{hi} but not the L-selectin^{lo} CD4⁺CD25⁺ T-regulatory cells are potent inhibitors of GVHD and BM graft rejection. *Blood*. 104 (12):3804-3812, 2004.

Thompson C. and Powrie F. Regulatory T cells. *Current Opinion in Pharmacology*. 4 (4):408-414, 2004.

Thornton A.M. and Shevach E.M. CD4⁺CD25⁺ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *The Journal of Experimental Medicine*. 188 (2):287-296, 1998.

Thornton A.M. and Shevach E.M. Suppressor effector function of CD4⁺CD25⁺ immunoregulatory T cells is antigen nonspecific. *The Journal of Immunology*. 164 (1):183-190, 2000.

Thornton A.M., Piccirillo C.A. and Shevach E.M. Activation requirements for the induction of CD4⁺CD25⁺ T cell suppressor function. *European Journal of Immunology*. 34 (2):366-76, 2004.

Ticchioni M., Deckert M., Mary F., Bernard G., Brown J. E. and Bernard A. Integrin associated protein (CD47) is a comitogenic molecule on CD3 activated human T cells. *The Journal of Immunology*. 158 (2):677-684, 1997.

Tsaknaridis L., Spencer L., Culbertson N., Hicks K., LaTocha D., Chou Y. K., Whitham R.H., Bakke A., Jones R.E., Offner H., Bourdette D.N. and Vandenbark A.A. Functional Assay for Human CD4⁺CD25⁺ Treg Cells Reveals an Age-Dependent Loss of Suppressive Activity. *Journal of Neuroscience Research*. 74 (2):296-308, 2003.

Vallejo A.N., Mugge L.O., Klimiuk P.A., Weyand C.M. and Goronzy J.J. Central role of thrombospondin-1 in the activation and clonal expansion of inflammatory T cells. *The Journal of Immunology*. 164 (6):2947-2954, 2000.

Vermeiren J., Ceuppens J.L., Van Ghelue M., Witters P., Bullens D., Mages H.W., Kroczeck R.A. and Van Gool S.W. Human T cell activation by costimulatory signal-deficient allogeneic cells induces inducible costimulator-expressing anergic T cells with regulatory cell activity. *The Journal of Immunology*. 172 (9):5371-5378, 2004.

Wakkach A., Fournier N., Brun V., Breittmayer J.P., Cottrez F. and Groux H. Characterization of dendritic cells that induce tolerance and T regulatory 1 cell differentiation in vivo. *Immunity*. 18 (5):605-617, 2003.

Walker L.S., Chodos A., Eggena M., Dooks H. and Abbas A.K. Antigen-dependent proliferation of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in vivo. *The Journal of Experimental Medicine*. 198 (2):249-258, 2003.

Wan Y.Y. and Flavell R.A. Identifying Foxp3-expressing suppressor T cells with a bicistronic reporter. *The Proceedings of the National Academy of Sciences online USA*. 102 (14):5126-5131, 2005.

Wing K., Fehervari Z. and Sakaguchi S. Emerging possibilities in the development and function of regulatory T cells. *International Immunology*. 18 (7):991-1000, 2006.

Wojciechowski S., Jordan M.B., Zhu Y., White J., Zajac A.J. and Hildeman D.A. Bim mediates apoptosis of CD127^{lo} effector T cells and limits T cell memory. *The European journal of immunology*. 36 (7):1-13, 2006.

Yagi H., Nomura T., Nakamura K., Yamazaki S., Kitawaki T., Hori S., Maeda M., Onodera M., Uchiyama T., Fujii S. and Sakaguchi S. Crucial role of FOXP3 in the development and function of human CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells. *International Immunology*. 16 (11):1643-1656, 2004.

Yamazaki S., Iyoda T., Tarbell K., Olson K., Velinzon K., Inaba K. and Steinman R.M. Direct expansion of functional CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells by antigen processing dendritic cells. *The Journal of Experimental Medicine*. 198 (2):235-247, 2003.

Ziegler S.F. FOXP3: Of Mice and Men. *Annual Reviews Immunology*. 24:209-226, 2006.

